

**Molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Enzyme
aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe

Henning Bouws

geboren am 17. Juni 1974, in Neuenhaus

2007

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger
Korreferent: Prof. Dr. Holger Zorn
Tag der Promotion: 15.08.2007

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2003 bis Juni 2007 im Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. R. G. Berger und Herrn Prof. Dr. H. Zorn für die Möglichkeit zur Promotion, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Weiterhin gilt mein Dank für die stete Diskussionsbereitschaft, für die konstruktive Kritik und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Ulrich Krings und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für das hervorragende Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, insbesondere meinem ehemaligen Laborkollegen Herrn Dr. Björn Hardebusch.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschung (AiF) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Susanne und meiner Freundin Ines, die mich immer moralisch unterstützt und mir vieles erleichtert haben.

Teile dieser Dissertation wurden im Rahmen des AIF-Forschungsvorhabens „Biotechnologische Oxyfunktionalisierung von Pinen-Abfallströmen zu hochwertigen Naturstoffen und chiralen Synthesebausteinen für die Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie“ durchgeführt. Auszüge wurden in Fachzeitschriften, als Vortrag und als Posterpräsentation veröffentlicht.

Veröffentlichungen:

1. Zorn H, Bouws H, Takenberg M, Nimtz M, Getzlaff R, Breithaupt D, Berger RG (2005) An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. *Biol Chem* 386:435-440
2. Linke D, Bouws H, Peters T, Nimtz M, Berger RG, Zorn H (2005) Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterisation and cloning. *J Agric Food Chem* 53:9498-9505
3. Taskova RM, Zorn H, Krings U, Bouws H, Berger RG (2006) Disruption of basidiomycete cells. *Z Naturforsch* 61C:347-350
4. Zorn H, Bouws H, Peters T, Nimtz M, Berger RG, (2005) *Pleurotus sapidus* – Edible mushroom and versatile enzyme factory. *Proceedings EURO FOOD CHEM XIII*, Hamburg 1:61-64
5. Bouws H, Berger RG, Zorn H (2006) Cytochrom P450 Monooxygenasen aus *Pleurotus sapidus* zur biotechnologischen Oxyfunktionalisierung von α -Pinen. *Lebensmittelchemie* 60:64
6. Bouws H, Berger RG, Zorn H (2006) Cytochrom P450-katalysierte Biosynthese von Aromastoffen. *Lebensmittelchemie* 60:99

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung und Abstract	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	3
2. Einleitung und Zielsetzung	4
2.1 Einleitung	4
2.2 Zielsetzung	7
3. Material und Methoden	8
3.1 Material	8
3.1.1 Mikroorganismen	8
3.1.2 Medien	8
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	10
3.1.4 Kits.....	15
3.1.5 Oligonukleotide	16
3.1.6 Vektoren	18
3.1.7 Enzyme.....	20
3.1.8 Marker.....	21
3.1.8.1 DNA-Marker.....	21
3.1.8.2 Proteinmarker	21
3.1.9 Geräte	22
3.1.10 Chemikalien	23
3.1.11 Gase	24
3.1.12 Lösungsmittel.....	25
3.1.13 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien	25
3.1.14 Bioinformatiksoftware und Datenbanken	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Mikrobiologie.....	27
3.2.1.1 Kultivierung von <i>P. sapidus</i> und Enzyminduktion	27
3.2.1.2 Kultivierung der Hefe <i>P. pastoris</i>	28
3.2.1.2.1 Ernte und Zellaufschluss	28
3.2.1.3 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	28
3.2.1.3.1 Ernte und Zellaufschluss	29
3.2.1.4 Kultivierung von <i>E. coli</i>	29

3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.2.1	RNA-Isolierung und Formaldehyd-RNA-Gelelektrophorese.....	29
3.2.2.2	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	30
3.2.2.3	Herstellung subtraktiver cDNA.....	30
3.2.2.4	Kapillargelelektrophorese	31
3.2.2.5	Isolierung genomischer DNA	32
3.2.2.6	Primerableitung.....	32
3.2.2.7	PCR und <i>Primer Walking</i>	33
3.2.2.8	Koloniehybridisierung	36
3.2.2.9	Quantitative Realtime-PCR.....	36
3.2.2.10	Klonierung und Expression	37
3.2.2.10.1	Restriktion und Ligation	38
3.2.2.10.2	Transformation in <i>E. coli</i> und Plasmidisolierung	39
3.2.2.10.3	Transformation in <i>P. pastoris</i>	40
3.2.2.10.4	Transformation in <i>S. cerevisiae</i>	41
3.2.3	Proteinbiochemie	41
3.2.3.1	Proteinbestimmung nach Lowry.....	41
3.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.2.3.3	Antikörperproduktion.....	42
3.2.3.4	<i>Western Blot</i>	42
3.2.3.5	Aktivitätsassay CyP450	43
3.2.4	Analytik	43
3.2.4.1	HPLC-Aktivitätsassay der Xanthophyllesterase.....	43
3.2.4.2	Biotransformation, Extraktion und GC-Analytik.....	44
4.	Ergebnisse	46
4.1	Das Cytochrom P450 Monooxygenase-System (CyP450).....	46
4.1.1	Stammscreening pinentransformierender Pilze	46
4.1.2	Molekularbiologische Identifizierung von <i>P. sapidus</i>	46
4.1.3	Induktion und RNA-Isolierung	48
4.1.4	Subtraktive cDNA-Synthese.....	50
4.1.5	Isolierung von cDNAs neuer CyP450 Monooxygenasen	51
4.1.5.1	Sequenzalignments und Primerableitungen	51
4.1.5.2	PCR und <i>Primer Walking</i>	53
4.1.6	Induktionsuntersuchungen mittels Realtime-PCR.....	58

4.1.7	Hypothetische 3D-Modelle der CyP450_1 und CyP450_3	62
4.1.8	Produktion synthetischer Antikörper	63
4.1.9	Klonierung und heterologe Expression in <i>P. pastoris</i>	64
4.1.10	Biotransformationsversuche	66
4.1.11	Isolierung der cDNA einer P450 Reduktase (EC 1.6.2.4)	67
4.1.11.1	Primerableitung und PCR	67
4.1.11.2	Induktionsuntersuchungen mittels Realtime-PCR.....	71
4.1.11.3	Hypothetisches 3D-Modell der P450 Reduktase	73
4.1.12	Das Expressionssystem <i>S. cerevisiae</i>	74
4.1.12.1	Klonierung und Biotransformationsversuche	74
4.1.12.2	Coexpression in <i>S. cerevisiae</i>	76
4.1.12.3	Biotransformationsversuche	77
4.2	Die Xanthophyllesterase aus <i>P. sapidus</i> (EC 3.1.1.x).....	78
4.2.1	Proteinbiochemische Darstellung.....	78
4.2.2	Aktivitätsversuche der Xanthophyllesterhydrolyse	78
4.2.3	Edman-Abbau und ESI-MS/MS	79
4.2.4	PCR-Screening	81
4.2.5	Hypothetisches 3D-Modell der Xanthophyllesterase.....	85
4.3	Isolierung der cDNA einer Peroxidase aus <i>P. sapidus</i> (EC 1.11.1.16).....	86
4.3.1	Koloniehybridisierung.....	86
4.3.2	Phylogenetische Einordnung	89
4.3.3	3D-Strukturvergleich der Peroxidasen aus <i>P. sapidus</i> und <i>P. eryngii</i> ..	90
4.4	Laccasen aus <i>P. sapidus</i> (EC 1.10.3.2).....	91
4.4.1	ESI-MS/MS, Sequenzalignments und Primerableitung.....	91
4.4.2	PCR und <i>Primer Walking</i>	94
4.4.3	Hypothetische 3D-Modelle der Laccasen	97
5.	Diskussion und Ausblick	100
5.1	Das CyP450 Monooxygenasesystem (EC 1.14.14.1 u. a.).....	100
5.1.1	Stammscreening pinentransformierender Pilze	102
5.1.2	Molekularbiologische Identifizierung höherer Pilze	103
5.1.3	Strategie zur Isolierung der cDNAs beteiligter CyP450.....	104
5.1.3.1	Induktion von Cytochrom P450 Monooxygenasegenen.....	105
5.1.3.2	Subtraktive cDNA-Synthese	106
5.1.4	Neue Cytochrom P450 Monooxygenasen aus <i>P. sapidus</i>	107

5.1.4.1	Induktionsanalysen	109
5.1.4.2	Dreidimensionale Strukturen und Reaktionsmechanismus	110
5.1.5	Heterologe Expression und Biotransformationsversuche	111
5.1.5.1	Solubilisierung	113
5.1.5.2	Biochemischer Nachweis mittels polyklonaler Antikörper	113
5.1.5.3	Biotransformationsversuche mit rekombinanter <i>P. pastoris</i>	114
5.1.6	NADPH-abhängige P450 Reduktase (CPR)	115
5.1.7	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	116
5.1.7.1	Coexpression von CyP450 und CPR_1	117
5.1.7.2	Biotransformationsversuche mit coexprimierender <i>S. cerevisiae</i>	117
5.2	Xanthophyllesterase aus <i>P. sapidus</i> (Q5W281)	119
5.2.1	Proteinbiochemische Darstellung	120
5.2.2	Isolierung der korrespondierenden cDNA	120
5.3	Polyvalente Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	122
5.3.1	cDNA-Isolierung durch Koloniehybridisierung	123
5.4	Laccasen aus <i>P. sapidus</i>	125
5.4.1	Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung	125
5.5	Ausblick	127
5.5.1	Das Cytochrom P450 Monooxygenase-System	127
5.5.2	Xanthophyllesterase aus <i>P. sapidus</i>	127
5.5.3	Polyvalente Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	128
5.5.4	Laccasen aus <i>P. sapidus</i>	128
6.	Literaturverzeichnis	129
7.	Abbildungsverzeichnis	146
8.	Tabellenverzeichnis	150
9.	Abkürzungsverzeichnis	152

1. Zusammenfassung und Abstract

1.1 Zusammenfassung

Aus einer Vielzahl höherer Pilze wurde der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* zur Oxyfunktionalisierung von α -Pinen zu Verbenol in einem Screening als der Pilz mit dem größten Biotransformationspotential identifiziert. Die bakterielle CyP450_{cam} aus *Pseudomonas putida* oxidiert α -Pinen zu Verbenol. Hierauf basierend wurden CyP450 Monooxygenasen des Basidiomyceten mit der Oxidation des Monoterpenkohlenwasserstoffs in Verbindung gebracht. Für die Nutzung heterologer Expressionssysteme, mit denen eine prozesstechnisch optimierte und effiziente Expression möglich ist, wurden auf molekularbiologischer Ebene zwei neue Cytochrom P450 Monooxygenasen (CyP450_1, CyP450_3) aus *Pleurotus sapidus* identifiziert und isoliert. CyP450_1 wurde im Wirt *Pichia pastoris* heterolog exprimiert und die Expression mittels spezifischer Antikörper im *Western Blot* nachgewiesen. Alternativ wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als zweites Expressionssystem etabliert. Die cDNAs der beiden Monooxygenasen CyP450_1 und CyP450_3 wurden hierzu in den Expressionsvektor pYES2.1 kloniert. Für eine funktionelle Expression wurde zusätzlich die cDNA einer P450 Reduktase (CPR_1) aus *Pleurotus sapidus* identifiziert und isoliert. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit zur funktionellen Coexpression mit beiden Monooxygenasen CyP450_1 und CyP450_3. Die Coexpressionsvektoren wurden konstruiert und in die Hefe transformiert. Eine enzymatische Aktivität bezüglich des Substrates α -Pinen und weiterer Substrate wurde weder als Interaktion mit dem endogenen Reduktasesystem der *S. cerevisiae*-Hefe, noch bei coexprimierenden *S. cerevisiae*-Klonen nachgewiesen.

Der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* verfügt über eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme. Das Sekretom beinhaltet neben verschiedenen lignolytischen Redoxenzymen auch Hydrolasen. Nach der Isolierung der Xanthophyllesterase wurde die cDNA dieses neuartigen Enzyms identifiziert und charakterisiert. Die Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* ist das erste Enzym der Lipase/Esterase-Familie aus einem Basidiomyceten, welches auf molekularer Ebene beschrieben wurde. Ebenfalls wurden eine neuartige polyvalente Peroxidase und zwei Laccasen auf molekularer Ebene identifiziert und charakterisiert.

Schlagwörter:

Pilze, Basidiomyceten, *Pleurotus sapidus*, Cytochrom P450, Sekretom, Carboxylesterase, Lipase, Polyvalente Peroxidase, Laccase

1.2 Abstract

Out of a multitude of preselected fungi the basidiomycetous fungus *Pleurotus sapidus* was identified as the most effective organism to oxidize α -pinene to verbenol. The monooxygenase P450_{cam} from *Pseudomonas putida* catalyze the oxidation of α -pinene to the flavour active compound verbenol. For the utilization of heterologous expression hosts, the cDNAs of two novel cytochrome P450 monooxygenases (CyP450_1, CyP450_3) were identified and isolated from a subtracted cDNA library of *Pleurotus sapidus*. CyP450_1 was heterologously expressed in *Pichia pastoris* and successful expression was shown by specific antibodies using Western Blot analysis.

Alternatively, a second heterologous expression system, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, was chosen and approved. The cDNAs of the monooxygenases CyP450_1 and CyP450_3 were cloned into the expression vector pYES2.1 and transformed into *S. cerevisiae* strain INV Sc1. Furthermore, a cDNA of a new P450 reductase (CPR_1) of *Pleurotus sapidus* was identified and cloned. This opens the possibility to clone both genes, CyP450_1 or CyP450_3, respectively, and CPR_1 for functional coexpression in yeast. Enzymatic activity for the substrate α -pinene or other substrates was not detected, neither with endogenous reducing activity, nor as a coexpression system.

The edible basidiomycetous fungus *Pleurotus sapidus* is a promising source for new extracellular enzymes. The secretome comprised lignolytic redox enzymes and various types of hydrolases. The cDNA of a new type of xanthophyllesterase was identified and characterized, representing the first lipase/esterase cDNA from a basidiomycete. Furthermore, a novel versatile peroxidase and two laccases were also characterized on a molecular level.

Key words:

Fungi, Basidiomycetes, *Pleurotus sapidus*, Cytochrome P450, Secretome, Carboxylesterase, Lipase, Versatile Peroxidase, Laccase

2. Einleitung und Zielsetzung

2.1 Einleitung

Aufgrund des steigenden Bedarfs an Produkten für unterschiedliche Anwendungsgebiete gewinnen Stoffumwandlungen durch den Einsatz technischer Enzyme zunehmend an Bedeutung. Dabei werden neben traditionellen Verfahren verstärkt neue Anwendungen erschlossen. Biokatalytische Stoffumwandlungen vereinen in der industriellen Produktion zahlreiche Vorteile. Es ergeben sich neue Reaktionsmöglichkeiten und Produkte, einfachere Herstellungsprozesse mit geringerem Energieverbrauch und reduzierter Bildung von Schadstoffen (Buchholz und Kasche, 1997).

Heute ist eine Vielzahl an Enzymen unterschiedlicher Klassen bekannt, wovon jedoch nur ein geringer Anteil eine industrielle Anwendung findet. Lediglich 19 Enzyme werden in einem Maßstab von 10 bis 1.000.000 Tonnen Produkt pro Jahr in Biokatalyseverfahren genutzt (Syldatk *et al.*, 2001). Die durch Biokatalysatoren erzeugten Produkte haben einen Marktwert von 100 Mrd. US\$, wobei etwa sechs Mrd. US\$ auf Feinchemikalien entfallen (Heiden und Erb, 2003).

Der Produktion von Biokatalysatoren tierischer Herkunft sind dadurch Grenzen gesetzt, dass die Enzyme als Nebenprodukte der fleischverarbeitenden Industrie anfallen. Pflanzliche Präparate erfordern eine große Menge an Ausgangsmaterial. Aufgrund der guten Kultivierbarkeit und der großen Biosyntheseleistung von Mikroorganismen finden vorzugsweise diese als Enzymquelle Anwendung (Ruttloff, 1994).

Höhere Pilze, insbesondere die Familie der *Pleurotaceae* aus der Klasse der Basidiomyceten, verfügen über ein bemerkenswertes enzymatisches Potential und können als neue Enzymquelle herangezogen werden (Zorn *et al.*, 2005b). Der essbare Pilz *Pleurotus sapidus* (*P. sapidus*), ein Verwandter des Speisepilzes Austerseitling *P. ostreatus*, produziert eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Enzyme, die für die Lebensmittelbiotechnologie von großem Interesse sind (Abb.2.1).



Abbildung 2.1: Fruchtkörper des Basidiomyceten *P. sapidus*

Von den intrazellulären Enzymen sind besonders Cytochrom P450 Monoxygenasen (CyP450), welche als Enzyme des Fremdstoffmetabolismus die Oxyfunktionalisierung von lipophilen Verbindungen in polarere Metabolite katalysieren, von Bedeutung. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion terpenoider Aromastoffe auf biotechnischem Wege, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Über eine regioselektive, CyP450-katalysierte Hydroxylierung von terpenoiden Substraten sind ausgehend von preiswerten und nahezu unbegrenzt verfügbaren Terpenkohlenwasserstoffen, durch Biotransformation mit Enzymen oder ganzen Zellen hochpreisige Aromastoffe zugänglich (Berger und Zorn, 2004).

Die wichtigste Quelle für Monoterpene ist mit einer Produktionsmenge von ca. 1,5 Millionen Tonnen pro Jahr Kiefernrohharz. In diesem Rahmen fallen etwa 160.000 Tonnen des bicyclischen Monoterpens α -Pinen an (Ohloff, 1994). Monoterpene gelten als Überschuskomponenten bei der Verarbeitung von Holz und etherischen Ölen, während die oxyfunktionalisierten Derivate als „natürliche Aromastoffe“ sehr viel attraktiver sind. Aufgrund der enzymatischen Herstellung und der damit verbundenen rechtlichen Beurteilung als „natürliche Aromastoffe“ steigt das wirtschaftliche Interesse. Zudem erfolgen die enzymatischen Reaktionen im Gegensatz zur Chemosynthese in wässriger Umgebung, was ökonomische und auch ökologische Vorteile mit sich bringt. Als Holz besiedelnde Pilze können Basidiomyceten als Quelle für oxyfunktionalisierende CyP450 Monoxygenasen herangezogen werden.

Das Sekretom dieses saprophytischen Weißfäulepilzes beinhaltet neben verschiedenen Hydrolasen ligninolytische Enzyme wie polyvalente Peroxidasen, Lignin-, Manganperoxidasen und Laccasen (Zorn *et al.*, 2005b). Dieses Sekretom ermöglicht den enzymatischen Aufschluss lignifizierter Biopolymere und somit den Zugang zu wirtschaftlich interessanten Bestandteilen wie Glucose, Pentosen und substituierten Aromaten.

Biokatalysatoren werden in aufwändigen, mehrstufigen Verfahren isoliert, welche oftmals teuer und mit verschiedenen Schwierigkeiten wie hohen Aktivitätsverlusten oder geringe Enzymausbeuten verbunden sind. Eine Möglichkeit, große Enzymmengen herzustellen, ist die heterologe Expression in geeigneten Wirtsorganismen, welche sich unter optimalen bioverfahrenstechnischen Bedingungen kultivieren lassen. Inzwischen sind Expressionssysteme kommerziell verfügbar, mit denen eine effiziente Produktion von Enzymen möglich ist. Voraussetzung hierfür ist die Identifizierung und Isolierung der korrespondierenden Gene bzw. cDNAs und deren Klonierung in geeignete Expressionsvektoren.

2.2 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der molekularbiologischen Charakterisierung neuartiger Enzyme aus dem Basidiomyceten *P. sapidus*. Die Gene verschiedener neuer Enzyme sollten identifiziert, die entsprechenden cDNAs kloniert und charakterisiert werden. Die Arbeit wurde in vier Aufgabengebiete eingeteilt:

1. Aus einer Vielzahl von höheren Pilzen zeigte *P. sapidus* das größte Biotransformationspotential für die Oxyfunktionalisierung von α -Pinen zu Verbenol. Im Rahmen eines AIF-Forschungsvorhaben sollten die hierfür verantwortlichen neuen Cytochrom P450 Monooxygenasen auf molekularbiologischer Ebene identifiziert und in den eukaryontischen Wirten *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) bzw. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) heterolog exprimiert werden.

Da dieser Basidiomycet über eine bemerkenswerte Ausstattung extrazellulärer Biokatalysatoren verfügt, sollten zusätzlich die cDNAs der folgenden, mit Ausnahme der polyvalenten Peroxidase, aus proteinbiochemischen Arbeiten bekannten Enzyme isoliert und charakterisiert werden.

2. In vorangegangenen Arbeiten wurde aus dem Kulturüberstand von *P. sapidus* eine Xanthophyllesterase mit neuartigen katalytischen Eigenschaften isoliert. Auf Peptiddaten basierend sollte die Gesamtsequenz der cDNA isoliert und kloniert werden.

3. Eine polyvalente Peroxidase, die bisher nur aus wenigen anderen Basidiomyceten bekannt war, sollte basierend auf Homologievergleichen auf molekularbiologischer Ebene identifiziert, charakterisiert und phylogenetisch eingeordnet werden.

4. Aufbauend auf proteinbiochemischen Arbeiten sollten die cDNAs zweier Laccasen isoliert, miteinander verglichen und charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mikroorganismen

Tabelle 3.1: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Stamm	Herkunft	Genotyp
<i>Pleurotus sapidus</i>	8266	DSMZ (Braunschweig)	-
<i>Pichia pastoris</i>	SMD 1168	Invitrogen (Karlsruhe)	<i>pep4Δ his4</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	INV Sc1	Invitrogen	<i>MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	TOP10F'	Invitrogen	<i>(proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn0 (Tet^R))</i> <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lac</i> <i>ZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1,</i> <i>araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK,</i> <i>rpsL (Str^R), endA1, nupG λ)</i>

3.1.2 Medien

SNL-Standardnährmedium (Sprecher und Hanssen, 1982)

Glucose	30,0 g L ⁻¹
Asparagin	4,5 g L ⁻¹
Hefextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung*	1 mL L ⁻¹
pH 6,0	
Agar-Agar für Plattenkultivierung	15 g L ⁻¹

***Spurenelementlösung**

FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,08 g L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,09 g L ⁻¹
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,03 g L ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
Titriplex III (EDTA)	0,4 g L ⁻¹

LB-Medium

Trypton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
10 x Glucose (20%)	100 mL
NaCl	10 g L ⁻¹
Ampicillin (optional)	50 µg L ⁻¹
Agar-Agar für Plattenkultivierung	15 g L ⁻¹

YPD-Medium

Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Pepton	20 g L ⁻¹
Agar-Agar für Plattenkultivierung	15 g L ⁻¹
10 x Glucose (20%)	100 mL
YPD-Geneticin-Agarplatten	0,25 mg mL ⁻¹
(Geneticin-Endkonzentration)	0,5 mg mL ⁻¹
	0,75 mg mL ⁻¹
	1,0 mg mL ⁻¹
	1,5 mg mL ⁻¹
	1,75 mg mL ⁻¹
	2,0 mg mL ⁻¹
	3,0 mg mL ⁻¹
	4,0 mg mL ⁻¹

MD-Medium

10 x Yeast Nitrogen Base (134 g L ⁻¹)	100 mL
500 x Biotin	2 mL
10 x Glucose (20%)	100 mL
Agar-Agar für Plattenkultivierung	15 g L ⁻¹

SC-Raffinose-Medium

Yeast Nitrogen Base (YNB)	0,67%
Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan	0,01%
Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin	0,005%
Raffinose	2%

SC-Galactose-Medium

YNB	0,67%
Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan	0,01%
Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin	0,005%
Galactose	2%
Raffinose	1%

3.1.3 Puffer und Lösungen

10 x Yeast Nitrogen Base (YNB)	134 g L ⁻¹
500 x Biotin	0,02%
10 x Glucose	200g L ⁻¹

Denaturierende RNA-Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

10 x FA-Gel-Puffer:

MOPS	41,86 g L ⁻¹
Natriumacetat	6,8 g L ⁻¹
EDTA	3,72 g L ⁻¹
pH 7	

FA Gel-Puffer:

10 x FA Gel-Puffer	100 mL L ⁻¹
Formaldehyd (37%)	20 mL L ⁻¹

5 x RNA Probenauftragspuffer:

Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)	16 µL
500 mM EDTA	80 µL
Formaldehyd (37%)	720 µL
Glycerol	2 mL
Formamid	3084 µL
10 x FA Gel-Puffer	4 mL

Agarosegelelektrophorese**50 x TAE-Puffer:**

Tris	242 g L ⁻¹
Essigsäure konz.	57,1 mL
0,5 M EDTA	100 mL
in 1 L H ₂ O	
pH 8	

6 x DNA-Loadingbuffer (Sambrook und Russel, 2001):

Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025 g
Glycerol	3 mL
in 10 mL H ₂ O	

SDS-PAGE**10 x Laufpuffer:**

Tris base	30 g L ⁻¹
Glycin	144 g L ⁻¹
SDS	10 g L ⁻¹ (1%)
SDS (modifiziert)	2 g L ⁻¹ (0,2%)

Probenpuffer:

Bromphenolblau	20 mg
20%ige SDS-Lösung	2 mL
1 M Tris/HCl, pH 6,8	1 mL
87%iges Glycerol	2,3 mL
in 8 mL H ₂ O	

Lower Tris (4 x):

Tris base	181,7 g L ⁻¹
SDS	4,0 g L ⁻¹
pH 6,8	

Upper Tris (4 x):

Tris base	60,55 g L ⁻¹
SDS	4,0 g L ⁻¹
pH 6,8	

Sammelgel (6%):

H ₂ O	900 µL
Upper Tris	375 µL
AA/Bis	225 µL
APS	7 µL
TEMED	3 µL

Trenngel (12%):

H ₂ O	2,7 mL
Lower Tris	1,5 mL
AA/Bis	1,8 mL
APS	15 µL
TEMED	7 µL

Wässrige Lösungen für die Silberfärbung (Blum *et al.*, 1988):

- I: 50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,5 mL L⁻¹ Formaldehyd (37%ig)
- II: 30% Ethanol
- III: 0,2 g L⁻¹ Na₂S₂O₃
- IV: 2 g L⁻¹ AgNO₃, 0,75 mL L⁻¹ Formaldehyd (37%ig)
- V: 60 g L⁻¹ Na₂CO₃, 0,5 mL L⁻¹ Formaldehyd (37%ig), 10 mg L⁻¹ Na₂S₂O₃
- VI: 10% Methanol, 12% Essigsäure

Lösungen für die Coomassiefärbung:

(Fixierung und Färbung)

Ethanol	40%
Essigsäure (konz.)	10%
Coomassie Brilliant Blue GR-250	290 mg L ⁻¹

(Entfärbung)

Ethanol	25%
Essigsäure konz.	8%

Western Blot

TBT-Puffer:

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%
Milchpulver (optional)	5%

Phosphatase-Puffer:

Tris, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	25 mM

Bromchlorindolylphosphat-Lösung (BCIP):

BCIP	50 µg mL ⁻¹
in H ₂ O	

Nitrobluetetrazoliumchlorid-Lösung (NBT):

NBT $75 \mu\text{g mL}^{-1}$
in 70% Dimethylformamid (DMF)

Zellaufschlusspuffer

Kaliumphosphatpuffer 50 mM
Glycerol 5%
Obas (optional) $0,05\%$
Cholsäure (optional) $0,2\%$
pH 6

Herstellung kompetenter Zellen (*E. coli*)

Lösung 1:

CaCl₂ $0,1 \text{ M}$
Tris-HCl 2 mM
pH 7,4

Lösung 2:

CaCl₂ $0,1 \text{ M}$
Tris-HCl 2 mM
Glycerol 10%
pH 7,4

3.1.4 Kits

Tabelle 3.2: Verwendete Kits

Produkt	Anwendung	Hersteller
All-tissue [®] DNA First DNA	DNA-Isolierung	Gen-ial (Troisdorf)
Gene Images AlkPhos [®] Direct Labelling and Detection	Kolonie- hybridisierung	Amersham Biosciences (Piscataway, USA)
MinElute [®] Gel-Extraction	DNA-Reinigung	Qiagen (Hilden)
Multi-Copy <i>Pichia</i> Expression Kit [®]	Expression in <i>P. pastoris</i>	Invitrogen
NucleoSpin [®] Plasmid DNA Purification	Plasmidisolierung	Macherey-Nagel (Düren)
PCR-Select [™] cDNA Subtraction Kit	Subtraktive cDNA-Synthese	BD Clontech (Mountain View, USA)
Plasmid [®] Purification	Plasmidisolierung	Qiagen
pYES2.1TOPO [®] TA Expression Kit	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	Invitrogen
QuantiTect [™] SYBR [®] Green PCR Kit	Realtime-PCR	Qiagen
RNA 6000 LabChip [®] Kit	Kapillargel- elektrophorese, Bioanalyser 2100	Agilent (Santa Clara, USA)
RNeasy [®] Plant Mini Kit	RNA-Isolierung	Qiagen
SMART [™] PCR cDNA Library Construction Kit	cDNA-Synthese	BD Clontech
TA-Cloning [®]	TA-Klonierung	Invitrogen
TOPO TA-Cloning [®]	TA-Klonierung	Invitrogen

3.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 3.3: Verwendete Oligonukleotide

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
SMART III- und CDS III-Primer			
3768	CT SMART 3 for	5'>CAACGCAGAGTGGCCATTATGG<3'	68,0°C
8444	CT SMART 3 for 2	5'>GCAGTGGTATCAACGCAGAGT<3'	64,0°C
8821	CT SMART 3 for 3	5'>AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG<3'	72,0°C
3769	CT CDS 3 rev	5'>ATTCTAGAGGCCGAGGCCGG<3'	62,0°C
8445	CT CDS 3 rev 2	5'>TAGAGGCCGAGGCCGGCCGAC<3'	70,0°C
1473	CT CDS 3 rev 3	5'>AGG CCG AGG CGG CCG ACA<3'	64,0°C
Sequenzierungsprimer			
-	M13 for	5'>GTA AAA CGA CGG CCA G<3'	50,0°C
-	M13 rev	5'>CAG GAA ACA GCT ATG AC<3'	50,0°C
-	GAL1 for	5'>AAT ATA CCT CTA TAC TTT AAC GTC<3'	62,0°C
-	V5C-term rev	5'>ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT<3'	66,0°C
-	5'AOX for	5'>GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC<3'	62,0°C
-	3'AOX rev	5'>GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC<3'	62,0°C
V6-Domäne der mitochondrialen SSU			
4813	V6U	5'>TTA GTC GGT CTC GGA GCA<3'	56,0°C
4814	V6R	5'>TGA CGA CAG CCA TGC AAC<3'	56,0°C
Cytochrom P450 Monooxygenasen			
1471	PSAP450 for 2	5'>GTT TCG G(ACT)C G(AC)C G(GC)A TTT GCC <3'	67,7°C
1472	PSA P450 for 3	5'>GC(AC) CG(GC) ATT TGC CCC GGC <3'	63,1°C
1474	PSA P450 for 1	5'>TTT CGG (ACT)CG ACG (GC)AT TTG CC <3'	62,6°C
4752	PSAP45072rev	5'>CCG GGG CAA AT(AG) CG(AGCT) CGA CCG<3'	72,1°C
4753	PSAP45072rev2	5'>CCG GGG CAA AT(AGCT) CG(AGCT) CG(AGCT) CCG<3'	73,0°C
4754	PSAP45080rev	5'>GGG CAA AT(AG) CG(AGCT) CGA CCG AAA CCG<3'	78,1°C
4755	PSAP45080rev2	5'>GGG CAA AT(AGCT) CG(AGCT) CG(AGCT) CCG AAA CCG<3'	79,0°C
9730	P450subfor64ges	5'>CAA TCA CAT CCT TGG AAG TAT CA<3'	64,0°C
9729	P450subrev64ges	5'>CGA CCC CAG GTT CAT GGC TA<3'	64,0°C
8421	P450_3Hämfor60	5'>GGT CGA CGC ATT TGC CCC <3'	60,0°C
8422	P450_3Hämrev60	5'>GGG GCA AAT GCG TCG ACC<3'	60,0°C
5045	P450_3forges60	5'>GCA GTG GTA TCA ACG CAG AG<3'	62,5°C
5046	P450_3revges60	5'>GGC TTA GGT TGA AAT CTC ATG G<3'	60,8°C
P450 Reduktase			
5022	redneu1afor58	5'>A(AG)A CCG G(CT)A CCG C(ACT)G AGG<3'	65,2°C
5023	redneu1arev58	5'>CCT C(AGT)G CGG T(AG)C CGG T(CT)T<3'	65,2°C
5030	redneu3for58	5'>AAC AAG AC(ACT) TAC GAA CA(CT) TAC A<3'	56,8°C
5031	redneu3rev58	5'>TGT A(AG)T GTT CGT A(AGT)G TCT TGT T<3'	56,8°C

Fortsetzung Oligonukleotide			
5032	redneu5afor58	5'>CTC C(ACT)T TCA G(CT)G G(CT)T TCG<3'	60,7°C
5033	redneu5arev58	5'>CGA A(AG)C C(AG)C TGA A(AGT)G GAG<3'	60,7°C
5024	redneu1bfor58	5'> AAA C(CT)G GCA C(CT)G C(CT)G AGG<3'	63,3°C
5025	redneu1brev58	5'> CCT C(AG)G C(AG)G TGC C(AG)G TTT<3'	63,3°C
5026	redneu2afor58	5'> TCG T(CGT)A TGG C(ACT)A C(AGCT) T ACG G<3'	61,2°C
5027	redneu2arev58	5'> CCG TA(AGCT) GT(AGT) GCC AT(ACG)A CGA<3'	61,2°C
5028	redneu2bfor58	5'> TGA (AG)CC (ACT)AC (CT)GA CAA CGC<3'	60,6°C
5029	redneu2brev58	5'> GCG TTG TC(AG) GT(AGT) GG(CT) TCA<3'	60,6°C
5034	redneu5bfor58	5'> CCC (ACT)TT CCG (CT)GG (CT)TT CG<3'	62,8°C
5035	redneu5brev58	5'> CGA A(AG)C C(AG)C GGA A(AGT)G GG<3'	62,8°C
2447	CPR_1for mod	5'>GGA TTC ATG AAC CAC CAT CAT CT<3'	55,3°C
2446	CPR_1rev60	5'>CCC GAA ATA CGG GAT ATC AGA<3'	57,9°C
1798	pYEScoXba I for	5'>TCT AGA AGG GAA GAA AGC GAA AGG<3'	61,0°C
1799	Xba I pYES rev	5'>GGG ACC TAG ACT TCA GGT TGT C<3'	62,1°C
Xanthophyllesterase			
3992	Lip2/E4 rev 3	5'> GCT TGG AA(ACG) AC(ACG) GC(AG) TCA CC <3'	64,0°C
0864	Lip2/E2 for	5'> GC(CT) ACC TTC ACC GGT ACC AC<3'	64,9 °C
2601	Lip2/E3 for	5'> GC(CT) AC(CT) TTC AC(CT) GGC ACC AC<3'	64,7 °C
2604	Lip2/E3 for 4	5'> GC(CT) AC(CT) TTC AC(CT) GGC ACT AC<3'	62,7 °C
8977	Lip2 gesamt for 2	5'> TGC CAT GTT CTT CGT TCT ACA <3'	60,0 °C
Peroxidase			
8279	Sonde 95 (DNA-Sonde)	5'>TTC GGC (AT)(AC)C GGT CG(CT) CG(CT) ATT TGC CCC G<3'	92,9°C
0009	PSA Peroxid for 64	5'>CCG AGG TAC ACG GGG AAG AT<3'	64,0°C
0010	PSA Peroxid rev 64	5'>TAC ATA TAC ACG GTT GTC ACA GT<3'	64,0°C
Laccasen			
6993	Lacc 2 for	5'>GCA GGT AAC CCC AAC CTG GA<3'	64,0°C
6994	Lacc 2 rev	5'>CAT CGT AAG CCG GGC AAA GT<3'	62,0°C
9558	PSA Lacc ges for 66	5'>AAG CCC CAC TTG AGA CAT TCT C<3'	66,0°C
9559	PSA Lacc ges rev 66	5'>GAA CAT GCA ACG GCT TTC ATT A<3'	62,0°C
Realtime-PCR			
4813	V6 for	5'>TTA GTC GGT CTC GGA GCA<3'	56,0°C
4814	V6 rev	5'>TGA CGA CAG CCA TGC AAC<3'	56,0°C
7022	RealtimeCYP1for56	5'>TTT CAA ACG TAA AGC CAA AGA<3'	52,0°C
7023	RealtimeCYP1rev56	5'>CAC AAT TAC GAA CAA GCT CT <3'	53,2°C
7024	RealtimeCYP3for56	5'>CTC CAA CAA GGT TTC TGC T<3'	54,4°C
7025	RealtimeCYP3rev56	5'>GAC ACC TTG CTT ATC CAT G<3'	54,5°C
7020	RealtimeCPRfor56	5'>CGT TCT CAA ATA CGA GTC C<3'	54,4°C
7021	RealtimeCPRrev56	5'>GAC CTT CAA TGG CAT AAC C<3'	54,4°C

Die Oligonukleotide wurden von der Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), der Operon GmbH (Köln) und von der MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

3.1.6 Vektoren

Tabelle 3.4: Verwendete Vektoren zur Klonierung und Expression

Vektor	Verwendung	Hersteller
pCR [®] 2.1	TA-Klonierung	Invitrogen
pCR [®] 2.1-TOPO	TA-Klonierung	Invitrogen
pPIC3,5K [®]	Expression in <i>P. pastoris</i>	Invitrogen
pYES [®] 2.1-TOPO	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	Invitrogen

Bei dem Klonierungsvektor pCR2.1 handelte es sich um einen TA-Vektor, bei dem mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte mit 3`A-Überhängen in den Vektor mit komplementären 3`-T-Überhängen ligiert wurden (Andres *et al.*, 1993). Die TA-Klonierungsstelle sowie eine multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site, MCS) lagen innerhalb des Reportergens der β -Galaktosidase, so dass ein Blau-Weiß-Screening durchgeführt wurde. Eine Selektion in *E. coli* wurde aufgrund der Resistenzgene für Kanamycin und Ampicillin erreicht. Der Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO ist analog aufgebaut, die Ligation erfolgte durch eine Topoisomerase I (s. Kapitel 3.2.2.10).

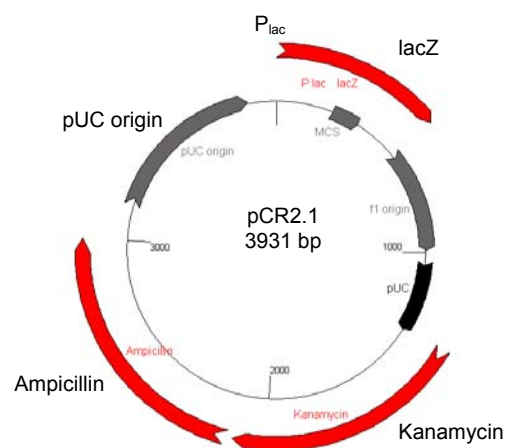


Abbildung 3.1: Klonierungsvektor pCR2.1. Plac: lacPromotor, lacZ: β -Galaktosidasegen, MCS: Multiple Klonierungsstelle, Kanamycin: Kanamycinresistenzgen, Ampicillin: Ampicillinresistenz, pUC origin: *high copy* –Replikationsursprung; GENTle

Der Vektor pPIC3.5K ermöglichte eine multiple Insertion ins Genom von *P. pastoris* und die Expression von Fremdgenen (Scorer *et al.*, 1994). Diese Hefe verfügte über keine eigenen Plasmide, so dass für die Expression ins Genom integrierende Vektoren benutzt wurden. Über Restriktionsschnittstellen, die nur einmal vorkamen, wurde der Vektor pPIC3.5KCyP450_1 linearisiert und nach der Transformation abhängig von dem verwendeten Restriktionsenzym über homologe Rekombination in den AOX1- bzw. HIS4-Locus integriert. Das Fremdgen unterlag der Kontrolle des mit Methanol induzierbaren AOX1-Promotors. In *E. coli* wurde über die Ampicillin bzw. Kanamycinresistenz selektiert, in der Histidin-auxotrophen Hefe *P. pastoris* über das Gen der Histidinoldehydrogenase (s. Kapitel 3.2.1.2).

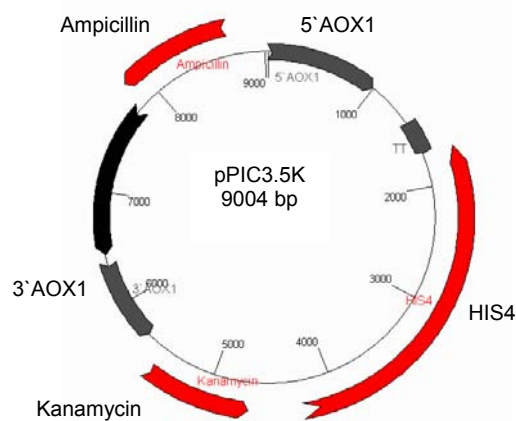


Abbildung 3.2: Expressionsvektor pPIC3.5K für *P. pastoris*. 5' AOX1: Promotorregion, TT: Transkriptionsterminationssignal, HIS4: Histidinoldehydrogenasegen, Kanamycin: Kanamycinresistenzgen, 3' AOX1: Rekombinationsregion, Ampicillin: Ampicillinresistenzgen

Für die Expression in *S. cerevisiae* wurde der Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO verwendet. Es handelte sich wie bei dem Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO um eine durch eine Topoisomerase I katalysierte TA-Klonierung (s. Kapitel 3.2.2.10). Der Vektor besaß die Codierung für eine optionale C-terminale Polyhistidin-Markierung (His-Tag), die für eine Proteinreinigung und für immunologische Nachweise herangezogen werden konnte. Das Expressionskonstrukt verfügte über den GAL1-Promotor für eine hohe Proteinexpression, welcher mit Galactose induziert und mit Glucose reprimiert wurde.

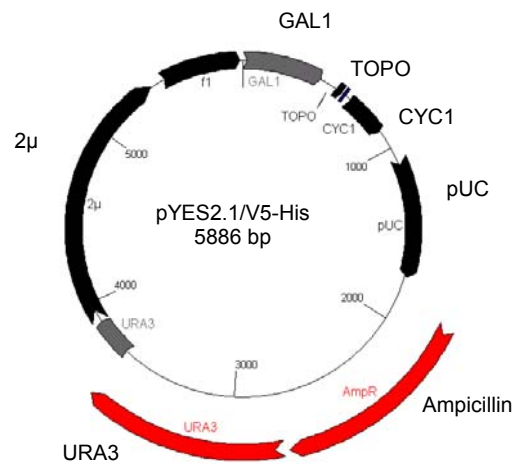


Abbildung 3.3: Expressionsvektor pYES2.1/V5-His für *S. cerevisiae*. GAL1: Promotor, TOPO: TOPO-TA-Klonierungsstelle, CYC1: Transkriptionsterminationssignal, pUC: pUC-Replikationsursprung für *E. coli*, Ampicillin: Ampicillinresistenzgen, URA3: Selektionsgen für uracilfreie Medien, 2 μ : Ursprung für *high copy* Replikation in *S. cerevisiae*

3.1.7 Enzyme

Tabelle 3.5: Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
Advantage™2 LD-Polymerase-Mix	cDNA-Synthese	BD Clontech
Bam H I	Restriktion	Fermentas (St. Leon-Rot)
Bgl II	Restriktion	Fermentas
HotStarTaq-Polymerase	PCR	Qiagen
Not I	Restriktion	Fermentas
Reverse Transkriptase	cDNA-Synthese	Invitrogen
RNase A	DNA-Isolierung	Macherey & Nagel
Rsa I	Restriktion	Fermentas
T4-Ligase	Ligation	Fermentas
Xba I	Restriktion	Fermentas
Xcm I	Restriktion	Fermentas

3.1.8 Marker

3.1.8.1 DNA-Marker

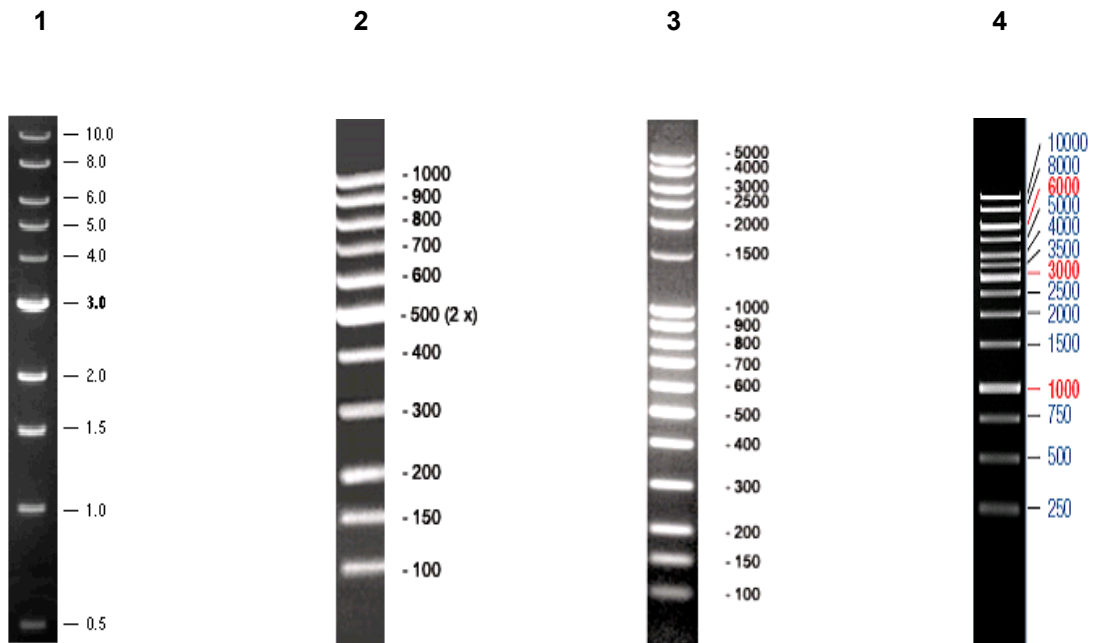


Abbildung 3.4: Verwendete DNA-Marker. 1: 1 kb Ladder [kb] (NEB, Schwalbach), 2: 100 bp DNA-Leiter [bp] (Roth), 3: 100 bp-DNA-extended [bp] (Roth), 4: 1 kb DNA-Ladder [bp] (Fermentas)

3.1.8.2 Proteinmarker



Abbildung 3.5: Verwendeter Proteinmarker für die SDS-PAGE. Roti-Mark Standard, 14,3 bis 200 kDa (Roth)

3.1.9 Geräte

Tabelle 3.6: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegelkammer	Sub-Cell GT	Bio-Rad (München)
Autoklav	5075 ELV	Systec (Wettenberg)
Autoklav	Varioklav 75S	H & P Labortechnik (Oberschleißheim)
Blockthermostat	MultiShaker FMS2	FINEPCR (Seoul, Korea)
Blottingkammer	Semi-dry Fast-Blot	Biometra (Göttingen)
Elektroporator	MicroPulser	Bio-Rad
E-pure-Anlage	D4623S	Barnstead (Leverkusen)
Inkubator	BE	Memmert (Schwabach)
Inkubator	Certomat HK	B. Braun (Melsungen)
Kapillargelelektrophorese	Bioanalyzer 2100	Agilent
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph (Kelheim)
Magnetrührer	IKAMAG RH	IKA-Labortechnik (Staufen)
pH-Meter	731 Calimatic	Knick (Berlin)
PCR-Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Realtime-PCR-Cycler	ABI Prism 7000	Applied Biosystems (Darmstadt)
Schüttler	HAT	Infors (Einsbach)
SDS-PAGE-Kammer	Minigel-System	Bio-Rad
Sterile Werkbank	Clean Air CA RE 4	Clean Air (Hilden)
Sterile Werkbank	safeflow 1.2	Nunc (Wiesbaden)
Transilluminator	Ti4	Biometra (Göttingen)
Thermoshaker	keine Angabe	Schuttron (Quedlinburg)
Ultraturrax	TP-18/10	IKA-Labortechnik
UV-VIS-Spektrofotometer	Lambda 12	Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim)
Vortex	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Zentrifuge	5415 C	Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge	RT7 Plus	Kendro (Langenselbold)

3.1.10 Chemikalien

Tabelle 3.7: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
AA/Bis (40%)	Roth
(+/-)- α -Pinen	Aldrich (Taufkirchen)
Agar-Agar	Merck (Darmstadt)
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ampicillin	Roth
BCIP	Sigma (Taufkirchen)
Biotin	Fluka (Seelze)
Bromphenolblau	Roth
BSA	Fluka
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Riedel de Haen (Seelze)
(+/-)-Campher	Fluka
CDP-Star	Amersham Biosciences
Cholsäure	Amersham Biosciences
Coomassie Brilliant Blue G 250	Merck
1,4-Cineol	Fluka
Cumarin	Baker (Griesheim)
Cumarinsäure	Roth
D-Glucose	Merck
dNTPs	Roth
D-Sorbitol	Roth
DTT	Merck
Ergosterol	Fluka
Ethidiumbromidlösung	Roth
FeCl ₃	Riedel de Haen
Formaldehyd	Aldrich (Seelze)
Formamid	Roth
Geneticindisulfat	Roth
Glycerol	Roth
D-(+)Galactose	Sigma
Hefeextrakt	Merck
IPTG	Roth
KH ₂ PO ₄	Fluka
K ₂ HPO ₄	Merck

Fortsetzung Chemikalien	
Laurinsäure	Aldrich
LB-Medium	Merck
LB-Agar	Roth
L-Glutaminsäure	Fluka
Methanol	Baker
Milchpulver	Roth
MnSO ₄	Fluka
Myristinsäure	Aldrich
NADPH	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Riedel-de-Haen
NaOH	Merck
NaCl	Roth
NBT	Biomol (Hamburg)
Obas (4-Octylbenzol Amidosulfobetain)	Calbiochem (Darmstadt)
Pepton aus Casein	Sigma
SDS	Roth
TEMED	Roth
Titriplex III (EDTA)	Merck
Triton X-100	Sigma
Tris	Fluka
Tris Base	Roth
Tris HCl	Roth
Zimtsäure	Fluka

3.1.11 Gase

Tabelle 3.8: Verwendete Gase

Gas	Verwendung	Lieferant
Druckluft (getrocknet)	Detektorgas Hilfsgas	Schneider (Reutlingen)
Helium	Trägergas GC-MS	Westfalen (Münster)
Stickstoff	Schutzgas Spülgas	Westfalen
Wasserstoff	Trägergas Detektorgas	Westfalen

3.1.12 Lösungsmittel

Tabelle 3.9: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Qualität	Verwendung	Hersteller
Aceton	redest.	Reinigung	Roth
Acetonitril	99,8%	HPLC	Promochem
Dichlormethan	99,8%	HPLC	Sigma-Aldrich
Diethylether	redest.	Extraktion	Roth
Ethanol	99%	DNA-Extraktion Emulsionsbrechung	Kraul & Wilkening & Stelling (Hannover)
Ethanol (vergällt)	96%	Desinfektion	Kraul & Wilkening & Stelling
Ethylacetat	98%	HPLC	Roth
Methanol	99,8%	HPLC	J.T. Baker
n-Hexan	99,8%	HPLC	Roth
Pentan	redest.	Extraktion	Roth

3.1.13 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien

Die Entsorgung der Lösungsmittel wurde durch die Wiederverwertung nach destillativer Reinigung weitgehend reduziert. Lösungsmittel, die nicht wieder verwertbar sind, wurden in folgenden Gruppen getrennt:

- a) nicht halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- b) nicht halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- c) halogenierte, wasserhaltige Lösungsmittel
- d) halogenierte, nicht wasserhaltige Lösungsmittel

Diese Lösungsmittel und Chemikalienreste wurden der zentralen Entsorgungseinrichtung der Universität Hannover zugeführt. Ethidiumbromid- und Phenol-Abfälle wurden getrennt gesammelt.

3.1.14 Bioinformatiksoftware und Datenbanken

Tabelle 3.10: Verwendete Bioinformatikprogramme und Datenbanken

Programm	Funktion	Referenz	Internet
Chromas Lite, Version 2.01	Sequenzbearbeitung	-	technelysium.com.au/ chromas.html
ClustalW	Sequenzvergleiche	Higgins <i>et al.</i> , 1994	ebi.ac.uk/clustalw/index.html
CN3D	3D-Modell Bearbeitung	Wang <i>et al.</i> , 2000	130.14.29.110/Structure/CN3D/ cn3d.shtml
GENtle	Sequenzbearbeitung Restriktionsschnittstellen	-	gentle.magnusmanske.de
Primer3	Primerkonstruktion	Rozen und Skaletsky, 2000	frodo.wi.mit.edu
<i>Reverse Translate a Protein</i>	Übersetzung Protein → DNA	-	vivo.colostate.edu/molkit/ rtranslate/index.html
Scansite	MW-, IEP-Kalkulation	Obenauer <i>et al.</i> , 2003	scansite.mit.edu/calc_mw_pi
Transseq	Übersetzung DNA → Protein	-	ebi.ac.uk/emboss/transeq
Datenbanken			
BRENDA	Enzyme	Schomburg <i>et al.</i> , 2002	brenda.uni-koeln.de
DRNelsonP450	CyP450 Monooxygenasen	Nelson <i>et al.</i> , 1993	drnelson.utmem.edu/ CytochromeP450.html
EMBL-EBI FASTA <i>Nucleic acids</i>	DNA-Datenbank	Pearson, 1990	ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide
EMBL-EBI FASTA <i>Protein</i>	Proteindatenbank	Pearson, 1990	ebi.ac.uk/fasta/asdprotein
Expasy Prosite	Proteindomänen Proteinfamilien	Hulo <i>et al.</i> , 2006	expasy.org/prosite
Expasy SWISS- MODEL	3D-Modell Berechnung	Schwede <i>et al.</i> , 2003	swissmodel.expasy.org
JGI	Genom <i>P. chrysosporium</i>	Martinez <i>et al.</i> , 2004	genome.jgi-psf.org/whiterot1/ whiterot1.home.html
Kazusa	<i>Codon usage</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2000	kazusa.or.jp/codon

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologie

3.2.1.1 Kultivierung von *P. sapidus* und Enzyminduktion

Die Stammhaltung von *P. sapidus* (DSMZ 8266) erfolgte auf SNL-Agarplatten, welche zuvor mit einem etwa 1 cm²-großen bewachsenem Agarstück angeimpft wurden, im Brutschrank bei 24°C.

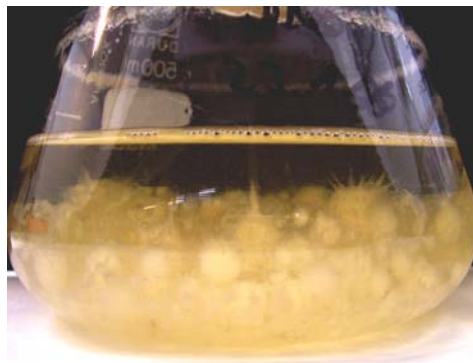


Abbildung 3.6: Der Basidiomycet *P. sapidus*. Submerskultur in 200 mL SNL-Medium nach 5 Kulturtagen im Inkubationsschüttler bei 24°C und 150 rpm

Die Vorkulturen wurden in 100 mL SNL-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben durchgeführt. Ein etwa 1 cm²-großes bewachsenes Agarstück wurde mittels Ultraturrax homogenisiert. Die Kultur wurde bei 150 rpm bei 24 °C inkubiert. Die Hauptkulturen wurden durch frisch homogenisierte Vorkultur (10 mL in 100 mL SNL-Medium) inokuliert und anschließend auf gleiche Weise kultiviert.

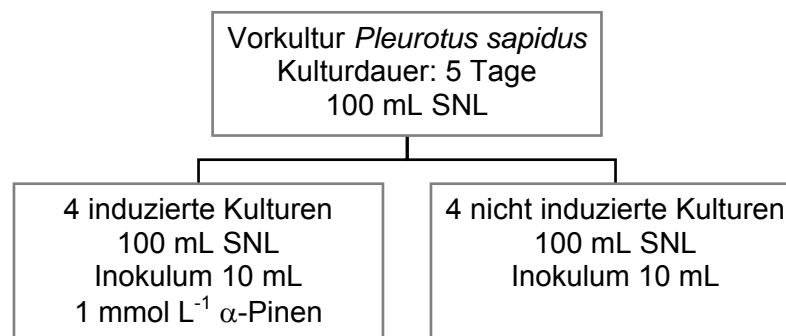


Abbildung 3.7: Kulturführung von *P. sapidus* für die Herstellung subtraktiver cDNA. Aus einer Vorkultur wurden vier induzierte und vier nicht induzierte Hauptkulturen angeimpft, von denen jeweils täglich eine Kultur geerntet wurde. Induziert wurde täglich mit 1 mM (+/-) α-Pinen

3.2.1.2 Kultivierung der Hefe *P. pastoris*

Die Stammhaltung der methylo-trophen Hefe *P. pastoris* wurde auf YPD-Platten bzw. in YPD-Medium bei 30°C durchgeführt.

Da der Vektor pPIC3.5K das Gen der Histidinoldehydrogenase trägt und der Expressionsstamm SMD 1168 histidin-auxotroph ist, erfolgte die Selektion der transformierten Klone auf histidinfreien MD-Agarplatten (Cregg und Higgins, 1995). Eine Selektion von Klonen mit Mehrfachinsertionen wurde auf YPD-Platten mit steigenden Geneticinkonzentrationen durchgeführt.

Die Vorkulturen für die Proteinproduktion im Submersverfahren wurden in BMGY-Medium, welches Glycerol als C-Quelle besitzt, angeimpft. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden Hauptkulturen im BMMY-Medium inokuliert. Dieses enthielt 0,5% Methanol, welches als C-Quelle und gleichzeitig als Induktor des AOX1-Promotors funktioniert.

Um Kulturen für längere Zeit bei -70°C lagern zu können, wurden diese im folgenden Verhältnis mit Glycerol vermischt. Zu 870 µL einer ÜN-Kultur wurden 130 µL steriles Glycerol hinzugegeben und anschließend gevortext. Die Kulturen sind für längere Zeit bei -70°C haltbar und können nach dem Auftauen wieder kultiviert werden.

3.2.1.2.1 Ernte und Zellaufschluss

Die Zellen wurden bei 4000 rpm 15 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen in gleichem Volumen Aufschlusspuffer aufgenommen und resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Glasperlen, wurde die Suspension 15 mal 30 Sekunden im Vortex gemischt (Schimpf *et al.*, 2002). Dieser mechanische Zellaufschluss erforderte eine ständige Kühlung auf Eis.

3.2.1.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Der uracil-auxotrophe Stamm INV Sc1 wurde auf YPD-Platten bei 30°C kultiviert, nach der Transformation wurde auf uracilfreien SC-Agarplatten selektiert. Die Vorkulturen wurden in YPD bzw. SC-Raffinose-Medium angeimpft. Eine Induktion des GAL1-Promotors erfolgte mit Galactose im Hauptkulturmedium. Die Glycerolkulturen wurden wie bei *P. pastoris* angelegt (s. Kapitel 3.2.1.2).

3.2.1.3.1 Ernte und Zellaufschluss

Der Zellaufschluss wurde mit Glasperlen/Vortex wie bei *P. pastoris* durchgeführt (s. Kapitel 3.2.1.2.1).

3.2.1.4 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierungen von *E. coli* erfolgten im LB-Vollmedium unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 250 rpm. Die Kulturen plasmidtragender Zellen wurden zur Gewährleistung der Plasmidstabilität und zur Verhinderung von möglichen Kontaminationen mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt. Die Glycerolkulturen wurden wie bei *P. pastoris* angelegt (s. Kapitel 3.2.1.2).

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolierung und Formaldehyd-RNA-Gelelektrophorese

Der Aufschluss der Basidiomycetenzellen erfolgte durch Mörsern gefrorener Zellpellets unter flüssigem Stickstoff. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels „RNeasy® Plant Mini Kit“ (Qiagen). Diese Methode beruht auf der Bindung der Gesamt-RNA an eine affinitätschromatographische Säule. Nach Inkubation mit einer DNase, der Entfernung der Proteine und der niedermolekularen Substanzen erfolgte die Elution der Gesamt-RNA von der Säule bei hoher Salzkonzentration (Farrell, 2005). Die Gesamt-RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Sambrook und Russel, 2001). Da mRNA *in vivo* Sekundärstrukturen bildet und Interaktionen mit Proteinen eingeht, wurde eine genaue Auftrennung der Moleküle nur unter denaturierenden Bedingungen unter Verwendung von Formaldehyd, Formamid und/oder DMSO erreicht (Farrell, 2005).

RNA unterliegt einer raschen Degradation durch RNasen. Aufgrund der großen Stabilität und Aktivität von RNasen wurde auf RNase-freie Geräte und Lösungen, beispielsweise durch eine Behandlung mit trockener Hitze (300°C für 3 Std.), SDS und/oder H₂O₂, geachtet.

3.2.2.2 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers, welcher an das Poly-A-Ende eukaryontischer mRNA bindet, wurde diese in cDNA umgeschrieben (Borson *et al.*, 1992). Durch den *Primer* SMART 3 wurde der Gegenstrang synthetisiert und die cDNA anschließend in einer Long-Distance-PCR (LD-PCR) amplifiziert.

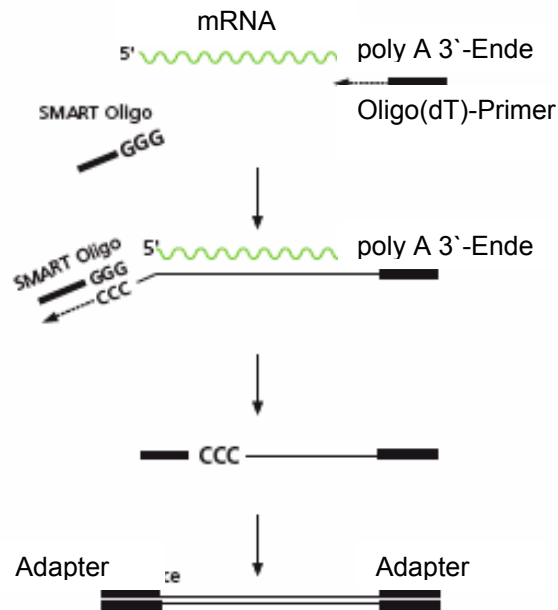


Abbildung 3.8: Reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA-Bank (BD Clontech). Bei der Erststrangsynthese bindet der Oligo(dT)-Primer an das Poly(A)-Ende der mRNA, die Reverse Transkriptase polymerisiert die DNA-Kopie der mRNA. Die Bindung des Primers SMART Oligo ermöglichte die anschließende exponentielle Amplifikation der Gesamt-cDNA

Die cDNA wurde in PCR-Screeningversuchen und bei der Koloniehybridisierung eingesetzt.

3.2.2.3 Herstellung subtraktiver cDNA

Diese Methode ermöglicht es, die mRNA-Populationen aus induzierten und nicht induzierten Kulturen miteinander zu vergleichen und die differentiellen Transkripte selektiv anzureichern (Diatchenko *et al.*, 1998). Ausgehend von 0,5 bis 1 µg Gesamt-RNA aus einer induzierten und einer nicht induzierten Kultur wurde das Ausgangsmaterial durch die oben beschriebene cDNA-Synthese hergestellt.

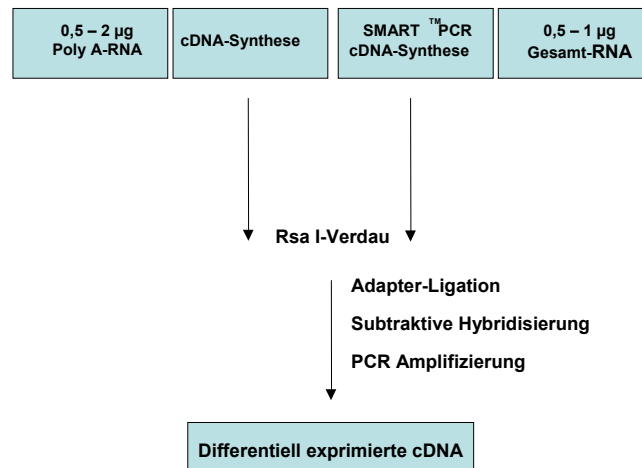


Abbildung 3.9: Subtraktive cDNA-Synthese, PCR-Select (BD Clontech). Die subtraktive cDNA kann ausgehend von 0,5-2 µg Poly(A)-RNA (mRNA) oder 0,5- 1 µg Gesamt-RNA synthetisiert werden. Nach der cDNA-Synthese, dem Rsa I-Verdau, der Adapterligation und der subtraktiven Hybridisierung wurde die cDNA durch *Nested-PCR* zweimal amplifiziert und in Screeningversuchen eingesetzt

Nach verschiedenen Reinigungsschritten wurde die cDNA mit dem Restriktionsenzym Rsa I geschnitten, erneut gereinigt, auf diese Weise für die Adapterligation vorbereitet. Die Ligation mit zwei unterschiedlichen Adaptoren ermöglichte nach zwei subtraktiven Hybridisierungen mit cDNA der nicht induzierten Kultur die exponentielle Amplifikation der differentiell exprimierten cDNA.

3.2.2.4 Kapillargelelektrophorese

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde anhand des „RNA 6000 LabChip® Kit“ mittels Bioanalyser 2100 (Agilent) bestimmt. Dieser auf einem Chip basierenden Methode der RNA-Analyse liegt das Prinzip der Kapillarelektrophorese zugrunde, wobei die Detektion der RNA anhand eines eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt.

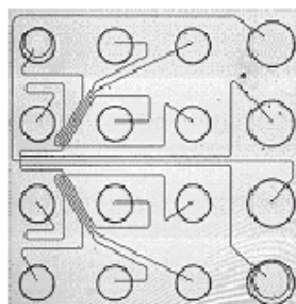


Abbildung 3.10: RNA 6000 LabChip® (Agilent). Detailansicht des Kapillarsystems mit 12 Probenkanälen und vier Kapillaren für den Fluoreszenzfarbstoff und Trennmatrix

Der Chip wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen. Die RNA wurde in die Probenaschen pipettiert und bewegte sich aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch Mikrokapillarkanäle. Die Gesamt-RNA wurde ihrer Größe entsprechend separiert und anhand des Fluoreszenzfarbstoffes detektiert. Die Ergebnisse wurden aufgezeichnet und mittels gerätespezifischer Software analysiert.

3.2.2.5 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde anhand des „All-tissue[®]DNA Kit“ (Gen-ial) isoliert. Die Methode basiert auf der enzymatischen Lyse der Zellen, der Präzipitation von Proteinen und anderen Zellbestandteilen und der anschließenden Fällung der DNA mit Isopropanol.

3.2.2.6 Primerableitung

Für die Konstruktion von Oligonukleotiden wurden Konsensussequenzen oder Peptiddaten herangezogen. Anhand der Programme *Reverse Translate a Protein* und der *Codon usage*-Tabellen (kazusa.or.jp/codon) wurden degenerierte *Primer* abgeleitet. Der Tabelle für *P. sapidus* liegen lediglich fünf Sequenzen zugrunde. Zusätzlich wurden bei der Primerableitung Codon-Informationen des nahen Verwandten *P. ostreatus* berücksichtigt. Anhand der ermittelten Sequenzen wurde mit dem Programm *Primer-Ableitung v1.00* (Taupp, 2007) zusätzlich eine *Codon usage*-Tabelle für *P. sapidus* erstellt (Tab. 3.11), die sich von den Kazusa-Tabellen kaum unterscheidet.

Tabelle 3.11: Codon usage von *P. sapidus*. Die Tabelle wurde mit dem Programm Primer-Ableitung v1.00 (Taupp, 2007) erstellt, AS: Aminosäure; relative Wahrscheinlichkeit [%]; N: absolute Anzahl verwendeter Triplets

Codon	AS	%	N	Codon	AS	%	N	Codon	AS	%	N	Codon	AS	%	N
TTT	F	22,3	37	TCT	S	18	32	TAT	Y	36,6	34	TGT	C	45,9	17
TTC	F	77,7	129	TCC	S	17,4	31	TAC	Y	63,4	59	TGC	C	45,1	20
TTA	L	6,1	15	TCA	S	12,9	23	TAA	*	30,8	4	TGA	*	46,2	6
TTG	L	21,1	52	TCG	S	21,9	39	TAG	*	23,1	3	TGG	W	100	41
CTT	L	25,1	62	CCT	P	28,6	58	CAT	H	50,7	36	CGT	R	17,8	24
CTC	L	23,9	59	CCC	P	33,0	67	CAC	H	49,3	35	CGC	R	28,9	39
CTA	L	6,9	17	CCA	P	24,1	49	CAA	Q	52,5	53	CGA	R	17,8	24
CTG	L	17,0	42	CCG	P	14,3	29	CAG	Q	47,5	48	CGG	R	14,1	19
ATT	I	35,4	64	ACT	T	29,8	54	AAT	N	35,7	50	AGT	S	12,4	22
ATC	I	52,5	95	ACC	T	31,5	57	AAC	N	64,3	90	AGC	S	17,4	31
ATA	I	12,2	22	ACA	T	21,0	38	AAA	K	44,7	42	AGA	R	9,6	13
ATG	M	100,0	60	ACG	T	17,7	32	AAG	K	55,3	52	AGG	R	11,9	16
GTT	V	25,0	44	GCT	A	32,9	77	GAT	D	43,3	74	GGT	G	32,5	64
GTC	V	38,6	68	GCC	A	25,2	59	GAC	D	56,7	97	GGC	G	37,1	73
GTA	V	15,3	27	GCA	A	24,4	57	GAA	E	52,3	56	GGA	G	14,7	29
GTG	V	21,0	37	GCG	A	17,5	41	GAG	E	47,7	51	GGG	G	15,7	31

Aufgrund des degenerierten Codes der DNA wurden sogenannte „Wobbels“ in die Sequenz eingefügt. An Positionen, deren Sequenzinformationen nicht hergeleitet werden konnten, wurden unterschiedliche Basen verwendet, so dass in der PCR verschiedene Primervarianten zum Einsatz kamen. Die Schmelztemperaturen (T_M) degenerierter *Primer* wurden anhand der $2^\circ\text{C}+4^\circ\text{C}$ -Regel errechnet (N: Anzahl):

$$T_M = N \times [\text{GC}] \times 4^\circ + N \times [\text{AT}] \times 2^\circ$$

Spezifische *Primer* mit festgelegten Schmelztemperaturen wurden mit Hilfe des Programms Primer3 konstruiert. Eine Kombination mit Restriktionsschnittstellen erfolgte durch Anfügen spezifischer Erkennungssequenzen an das 5'-Ende des Oligonukleotids.

3.2.2.7 PCR und *Primer Walking*

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, welche gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge (Template) gebunden sind (Ausubel *et al.*, 1990). Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der

Nukleotidsequenzinformationen der Primerbindestellen. Ein PCR-Reaktionsansatz setzte sich, wie in Tabelle 3.12 beschrieben, zusammen.

Tabelle 3.12 : Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit HotStarTaq-Polymerase (Qiagen)

Komponenten	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10 x TaqPCR Puffer	5 µL	1 x
H ₂ O	variabel	-
<i>Primer A</i>	variabel	~ 0,3 µM
<i>Primer B</i>	variabel	~ 0,3 µM
dNTPs	1 µL	200 µM je dNTP
Taq-Polymerase	0,5 µL	2,5 units/Reaktion
Template-DNA	variabel	< 500 ng/Reaktion
Gesamtvolumen	50 µL	-

Anhand des PCR-Cyclers wurden die Reaktionszeiten und Inkubationstemperaturen programmiert (Tab. 3.13). Einzelne Faktoren variierten aufgrund der Wahl der DNA-Polymerase, der Art und der Konzentration des Templates, der Schmelztemperatur der verwendeten *Primer* und der Länge des PCR-Produktes.

Tabelle 3.13: Temperaturprogramm der PCR-Reaktion mit HotStarTaq-Polymerase (Qiagen)

Reaktion	Zeit	Temperatur
Aktivierung der HotStarTaq	5 min.	95°C
Zyklen		
Denaturation	0,5-1 min.	95°C
Annealing	0,5-1 min.	45-65°C
Extension	0,5-2,5 min.	72°C
Zyklusanzahl	25-40	-
Final Extension	10 min.	72°C

Die angegebene Zusammensetzung und Programmierung der PCR bezieht sich auf die in den meisten Fällen verwendete der HotStarTaq-Polymerase (Qiagen). Amplifikationen von Gesamt-cDNA und von PCR-Produkten größer als 3 kb wurden mittels Advantage™2 LD-PCR-Polymerase-Mix (Clontech) durchgeführt. Dieser enthält neben einer *Taq*-Polymerase-Mutante noch eine *Proofreading*-Polymerase

mit Korrekturlesefunktion. Diese Kombination gestattete die Amplifikation langer cDNA-Sequenzen mit hoher Ausbeute bei gleichzeitig verminderter Fehlerrate.

Die Verwendung von Annealingtemperaturgradienten ermöglichte die Kontrolle der Bindungsspezifität der verwendeten degenerierten Primer. Der Gradient reichte im Allgemeinen von 5°C unterhalb bis zur berechneten Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaares.

Bei der Kolonie-PCR wurden transformierte *E. coli*-Klone bzw. Hefe-Klone auf die Anwesenheit der klonierten Inserts überprüft. Die Kolonien wurden direkt als Template verwendet. Durch den Aktivierungsschritt der mit einem Antikörper inaktivierten HotStarTaq-Polymerase wird gleichzeitig bakterielle DNA zugänglich. Die Hefen *P. pastoris* und *S. cerevisiae* wurden zur Durchführung einer Kolonie-PCR zusätzlich vorher in 0,2%iger SDS-Lösung 10 min. bei 95°C inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand als Template eingesetzt.

Die Gesamtsequenzen der isolierten Transkripte wurden ausgehend von cDNA-Fragmenten durch *Primer Walking* ermittelt.

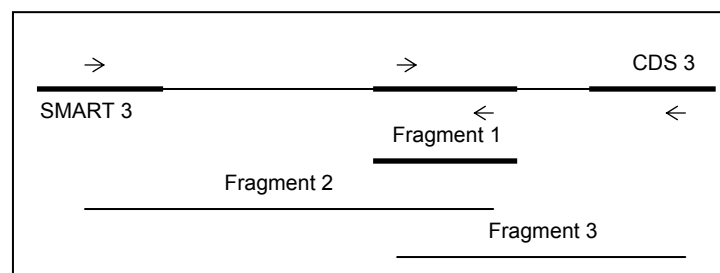


Abbildung 3.11: Prinzip des *Primer Walking*. Vom isolierten und sequenzierten cDNA-Fragment 1 wurden *Primer* (→) abgeleitet und diese in PCR-Reaktionen mit den von den Adaptoren der cDNA-Synthese SMART 3 und CDS 3 abgeleiteten Primern kombiniert. Durch Überlappungen der Fragmente 1, 2 und 3 wurde die Gesamtsequenz ermittelt, amplifiziert, kloniert und sequenziert

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) und wurde von der GATC Biotech AG (Konstanz) und der MWG Biotech AG durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Chromas Lite 2.01.

3.2.2.8 Koloniehybridisierung

Die Gesamt-cDNA aus *P. sapidus* wurde amplifiziert und über TA-Klonierung in den Vektor pCR2.1 ligiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden von den LB-Platten auf Hybond™N⁺-Membranen (Amersham Biosciences) transferiert und die Zellen durch Behandlung der Membran mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl 5 min. bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde der Filter zweimal 5 min. in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) und 1,5 M NaCl neutralisiert. Nach Entfernung der Zellreste und Waschen der Membran wurde die DNA durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C an den Filter gebunden.

Für die Herstellung der DNA-Sonden wurden Oligonukleotide mit vorgegebener Sequenz synthetisiert und diese kovalent an eine alkalische Phosphatase gebunden (Gene Images AlkPhosDirect Labelling and Detection, Amersham).

Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Filter erfolgte in Glasröhren im Hybridisierungsöfen. Die Filter wurden im Hybridisierungspuffer bei 55 °C für 15 min. prähybridisiert und nach Zugabe der Sonde über Nacht hybridisiert. Die ungebundenen sowie die unspezifisch gebundenen Sonden wurden durch insgesamt vier Waschschrte entfernt. Die Stringenz der Sondenbindung ist von der Hybridisierungstemperatur und der Temperatur der ersten Waschschrte abhängig. Die erforderliche Temperatur leitet sich aus der Sequenz und der Länge der verwendeten Sonde ab.

Die Detektion erfolgte mittels gebundener alkalischer Phosphatase und dem künstlichen Substrat CDP[®]-Star (Amersham). Bei der Chemilumineszenzreaktion erfolgte nach enzymatischer Dephosphorylierung des Substrates eine Lichtemission bei 466 nm, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde.

3.2.2.9 Quantitative Realtime-PCR

Der quantitative Nachweis von mRNAs wurde mittels Realtime-PCR durchgeführt. Bei der Realtime-PCR wurde die Produktakkumulation in Echtzeit untersucht (Heid *et al.*, 1996). Die Identifizierung der exponentiellen Phase der Reaktion ermöglichte die Quantifizierung der Templatmenge. Die Messung der Produktzunahme geschah anhand der Fluoreszenz, welche in Abhängigkeit von der Produktmenge entsteht. Der heute üblicherweise verwendete DNA-Farbstoff ist der Cyaninfarbstoff SYBR Green I. Die genaue Struktur wurde von den Lizenzinhabern

bisher nicht veröffentlicht (Yue *et al.*, 1994; Patent 05321130 der US-Patentbehörde). Der Farbstoff bindet sequenzunspezifisch in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA. Nach Anregung mit Blaulicht (480 nm) fluoresziert er etwa 1000mal stärker als der freie Farbstoff und eignet sich daher gut, die Bildung doppelsträngiger PCR-Produkte zu verfolgen (Morrison *et al.*, 1998).

Tabelle 3.14: Zusammensetzung einer Realtime-PCR-Reaktion mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)

Komponenten	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	25 µL	1 x
H ₂ O	variabel	-
<i>Primer A</i>	variabel	0,3 µM
<i>Primer B</i>	variabel	0,3 µM
Template	variabel	< 500 ng/Reaktion
Gesamtvolumen	50 µL	-

Der QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) enthält neben der HotStarTaq-Polymerase, dem Puffer und den dNTPs ebenso den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Tab. 3.14), der bei Bindung an doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei 520 nm emittiert.

3.2.2.10 Klonierung und Expression

Die in einer Screening-PCR amplifizierte Banden wurden vor der Sequenzierung in den Vektor pCR2.1 bzw. pCR2.1-TOPO zwischenkloniert. Die thermostabile Taq-Polymerase produziert 3'-A-Überhänge. Die PCR-Produkte wurden direkt in den TA-Vektor mit komplementären 3'-T-Überhängen mittels T4-Ligase kloniert. Der Vektor pCR2.1-TOPO verfügt über eine kovalent gebundene Topoisomerase I, welche durch Umkehr der natürlichen Aktivität die Ligation des Inserts in den Vektor katalysiert (Shuman, 1994).

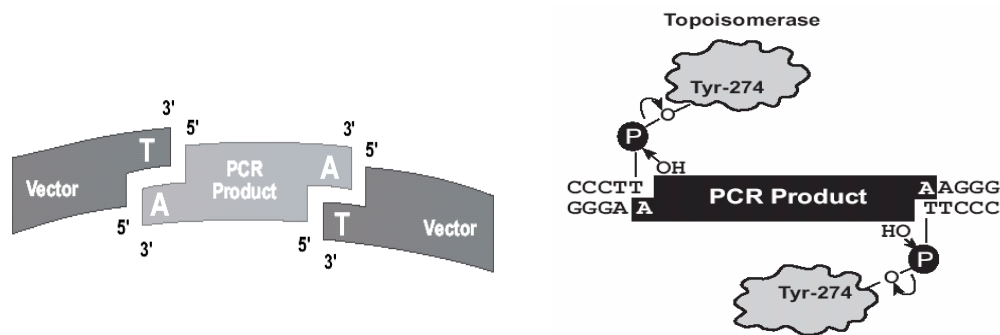


Abbildung 3.12: Das TA-Klonierungsprinzip (Invitrogen). Die Klonierung in den Vektor pCR2.1 wird durch die T4-Ligase (links), in den Vektor pCR2.1-TOPO durch die kovalent gebundene Topoisomerase I (rechts) katalysiert

Nach der Klonierung wurden die Vektoren in *E. coli* transformiert, positive Klone durch Blau-Weiß-Selektion und Kolonie-PCR identifiziert und die daraus isolierten Plasmide sequenziert. Der Umweg der Zwischenklonierung verhinderte die Überlagerung verschiedener PCR-Produkte in einer DNA-Bande, so dass eine Sequenzierung möglich wurde.

Für die Expression in *P. pastoris* wurde der Expressionsvektor pPIC3.5K mit den Restriktionsenzymen Bam H I und Not I asymmetrisch geschnitten und linearisiert. Das Insert, die cDNA der CyP450_1, wurde auf die gleiche Weise aus dem Klonierungsvektor pCR2.1 geschnitten und anschließend mittels T4-Ligase in den neuen Vektor ligiert. Die Wahl von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen verhinderte die Möglichkeit der Rezirkularisierung und gibt die Richtung des codogenen Strangs im neuen Vektor vor.

Für die Umklonierung der Inserts CyP450_1, CyP450_3 und CPR_1 in den Expressionsvektor pYES2.1 für *S. cerevisiae* wurde das bereits beschriebene Prinzip der TOPO-TA-Klonierung verwendet.

3.2.2.10.1 Restriktion und Ligation

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und spalten doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Man unterscheidet drei Klassen von Restriktionsenzymen. In der Molekularbiologie werden Typ II-Restriktionsenzyme benutzt. Diese spalten im Gegensatz zu den Enzymen vom Typ I oder III die DNA spezifisch innerhalb einer Erkennungssequenz, wobei sie für diesen Vorgang Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor

benötigen. Für jede Restriktionsendonuklease gibt es optimale Inkubationstemperaturen und Reaktionspuffer. Ein Restriktionsansatz mit einem Volumen von 10 μL setzte sich wie folgt zusammen:

0,1-1 μg	DNA
1 μL	10 x Reaktionspuffer (Qiagen)
1 μL	Restriktionsenzym ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$)
in 10 μL	H_2O

Die Ansätze wurden zwei bis sechs Stunden bei der Optimaltemperatur des Restriktionsenzym im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym für 15 min. bei 65 bzw. 80°C.

Die T4-DNA-Ligase ist für die Ligation von DNA-Fragmenten besonders geeignet, da sowohl komplementäre "*sticky ends*" als auch "*blunt ends*" ligiert werden können. Die Ligation erfolgte ÜN bei 4°C oder mindestens für eine Stunde bei Raumtemperatur. Bei der Abschätzung des Verhältnisses Vektor zu Insert wurde ein molares Verhältnis zwischen Vektor und Insert von 1:3 bis 1:5 eingehalten, um eine Rezirkularisierung des Vektors zu vermeiden. Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 μL bestand aus folgenden Komponenten:

10 ng	Vektor-DNA
x ng	Insert-DNA
2 μL	T4-DNA-Ligase ($1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$)
2 μL	10x T4-DNA-Ligasepuffer (Fermentas)
in 20 μL	H_2O

Nach der Ligation der DNA-Fragmente in Plasmide wurden diese für die Transformation in kompetente Zellen eingesetzt.

3.2.2.10.2 Transformation in *E. coli* und Plasmidisolierung

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 200 mL einer Bakterienkultur im LB-Medium mit einer O.D. von etwa 0,8 - 0,9 benötigt. Diese Kultur wurde 15 min. auf Eis gekühlt, danach bei 4°C und 4000 rpm für 10 min. zentrifugiert und das Pellet anschließend in 10 mL Lösung 1 (s. Kapitel 3.1.3) resuspendiert. Nach erneuter

Zentrifugation wurde das Pellet in 10 mL Lösung 2 (s. Kapitel 3.1.3) aufgenommen, je 200 μ L in vorgekühlte 1,5 mL Eppendorfgefäße portioniert und diese direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Eine ständige Kühlung der Zellen und der Lösungen auf Eis war zwingend notwendig. Die so behandelten Zellen waren zur Aufnahme freier DNA fähig.

Für die Transformation wurden die Aliquots mit kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 100 μ L der Zellen und 1-2 μ L Plasmid-DNA (10-100 ng) zusammengegeben und danach für 20 min. auf Eis gestellt. Der Hitzeschock für 5 min. bei 37°C im Wasserbad ermöglichte die Aufnahme der Plasmid-DNA. Um die auf dem Plasmid vorhandene Antibiotikaresistenz auszubilden, wurden 200 μ L LB-Medium hinzugeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in 100 μ L Medium aufgenommen und auf antibiotikahaltigen Selektions-LB-Platten ausplattiert.

Da der verwendete Vektor pCR2.1-TOPO das Gen einer Ampicillinresistenz trug, wuchsen nur positive Klone auf Ampicillin-haltigen Agarplatten. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) lag innerhalb des Reportergens β -Galaktosidase (*lacZ*), so dass eine Klonierung durch Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal und IPTG enthaltenen Platten überprüft wurde. Der Einbau eines Inserts in die MCS zerstörte das Leseraster des *LacZ*-Gens, die Kolonien blieben weiß. Lag eine Insertion nicht vor, so wurde die β -Galaktosidase aktiv exprimiert und es entstand aus dem farblosen Substrat X-Gal der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-,4'-dichlorindigo.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anhand des „Plasmid[®]Purification Kits“ (Qiagen) bzw. „NucleoSpin[®] Plasmid DNA Purification“ (Macherey-Nagel). Diese Methode beruhte auf der alkalischen Lyse mit anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine affinitätschromatographische Säule. Nach Entfernung der RNA, der Proteine und niedermolekularen Substanzen bei mittleren Salzkonzentrationen erfolgte im letzten Schritt die Elution der DNA von der Säule bei hoher Salzkonzentration (Birnboim und Doly, 1979).

3.2.2.10.3 Transformation in *P. pastoris*

Die Transformation freier DNA in *P. pastoris* wurde durch Elektroporation erreicht. Die Elektroporation ist ein Verfahren, um Zellmembranen permeabel zu machen. Ein elektrisches Feld, das durch einen schnell entladenden Kondensator erzeugt wurde, bewirkte die Bildung von Lücken in der Zellmembran, welche sich innerhalb von

Millisekunden wieder schließen (Alberts *et al.*, 2005). Die Poreninduktion bedingt durch den Verlust der Semipermeabilität der Membran einerseits die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile, andererseits die Aufnahme freier DNA. Eine Selektion wurde auf der Histidin-Auxotrophie des Wirtsstammes SMD 1168 und der Geneticinresistenz basierend durchgeführt (s. Kapitel 3.1.6).

3.2.2.10.4 Transformation in *S. cerevisiae*

Die Transformation in *S. cerevisiae* wurde wie bei *P. pastoris* ebenfalls mittels Elektroporation durchgeführt. Die anschließende Selektion erfolgte aufgrund der Uracil-Auxotrophie des Wirtes auf uracilfreien Medien.

3.2.3 Proteinbiochemie

3.2.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Diese quantitative Proteinbestimmung basierte auf einer Kombination der Biuret-Reaktion der Peptid-Bindung mit Kupferionen in alkalischer Lösung und der Reduktion des Folin-Reagenzes durch Tyrosin und Tryptophan (Lowry *et al.*, 1951). Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem „DC Protein Assay“ von Bio-Rad. Bei Lösung A handelte es sich um eine alkalische Kupfertartrat-Lösung, Lösung B war ein verdünntes Folin-Reagenz. 20 µL Probelösung wurden mit 100 µL Reagenz A und 800 µL Reagenz B vermischt. Die Lösung ergab nach 10 min. eine blaue Färbung mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm. Als Referenz wurde Wasser verwendet.

3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitze denaturierten Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe möglich ist. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der bekannter Proteine (Lämmli, 1979).

3.2.3.3 Antikörperproduktion

Als geeignete Antigendeterminante zur Produktion synthetischer, polyklonaler Antikörper wurde die an der Oberfläche lokalisierte Aminosäuresequenz CMLEAAPEDKPDNYE ausgewählt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden von der Firma Biogenes GmbH durchgeführt.

- Synthese des Peptids CMLEAAPEDKPDNYE
- Reinigung durch HPLC
- Massenspektrometrische Kontrolle durch MALDI-TOF
- Konjugatherstellung
- Produktion der Antikörper in Kaninchen
- IgG-Titerbestimmung durch ELISA

Der Antikörper wurde im immunologischen Screening nach exprimierenden Klonen im *Western Blot* eingesetzt.

3.2.3.4 *Western Blot*

Für den *Western Blot* wurden Nitrocellulose-Membran und Blottingpapier (Schleicher & Schüll) auf SDS-Gelgröße zugeschnitten in der Blotting-Apparatur plaziert. Vorher wurden Membran und Blottingpapier im Blottingpuffer (80% SDS-Laufpuffer+ 20% Methanol) 10 min. äquiliibriert. Der Blot erfolgte für drei Stunden bei einer Stromstärke von 40 mA. Anschließend wurde die Membran über Nacht in TBT-Puffer mit 5% Milchpulver bei 4 °C inkubiert.

Die Inkubation mit dem CyP450_1-spezifischen Antikörper erfolgte in TBT+ 5% Milchpulver ebenfalls über Nacht bei 4 °C im Kühlraum.

Nach Waschen in TBT-Puffer (2 mal 30 min.) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen, Sigma) in TBT-Puffer+ 5% Milchpulver für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in TBT-Puffer wurde die Membran für 5 min. in Phosphatase-Puffer äquiliibriert.

Durch die katalytische Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde das Substrat BCIP (Bromchlorindolylphosphat) dephosphoryliert. Zusammen mit dem zweiten Substrat NBT (Nitrobluetetrazoliumchlorid) erfolgte durch Entstehung eines

blauvioletten Präzipitates die Visualisierung. Die Entwicklung wurde in 20 mL Phosphatase-Puffer mit 70 µL BCIP-Lösung und 90 µL NBT-Lösung durchgeführt.

3.2.3.5 Aktivitätsassay CyP450

Der CyP450-Aktivitätsassay basiert auf dem photometrisch messbaren Verbrauch des Cofaktors NADPH. Die Reaktion fand im 50 mM Phosphatpuffer (pH 6) in einer 1 mL Küvette statt. Hinzugegeben wurden je Reaktionsansatz 1 µg Gesamtzellprotein als Zellysate, 10 µL einer NADPH-Lösung (20 mM) und zum Start der Reaktion 10 µL einer Substratlösung (10 mM in Methanol). Die verwendeten Substrate sind in der Tabelle 4.8 aufgelistet. Die Extinktionsabnahme ist proportional zur CyP450-Aktivität. Die Absorption wurde bei 340 nm bei Raumtemperatur gemessen (modifiziert nach Akiyama *et al.*, 2004).

3.2.4 Analytik

3.2.4.1 HPLC-Aktivitätsassay der Xanthophyllesterase

Der Versuchsansatz (pH 6,8) setzte sich aus 7,1 mg Paprikaoleoresin, 1,2 g Triton X-100, 8,8 mL Mineralsalzmedium und 0,2 mL CaCl₂-Lösung (1 M) zusammen. Als Positivkontrolle dienten 350 µL der aktiven GPC-Fraktion. Die zu untersuchende Probe bestand aus einer ausgeschnittenen Bande einer modifizierten SDS-PAGE mit verringertem SDS-Gehalt. Inkubiert wurde für 14 Stunden bei 24°C und 150 rpm.

Die Extraktion erfolgte mit einem Gemisch aus Methanol/n-Hexan/Methylacetat (1:1:1). Eingeengt wurde bei 40°C und 20 kPa. Anschließend wurde die Probe in tert-Butyl-Methylether, Methanol, BHT (1:1:0,01) aufgenommen und mittels HPLC analysiert.

Tabelle 3.15: HPLC-Anlage und Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*

HPLC-DAD	
Pumpe	PU-980 (Jasco)
Degasser	DG-980-50 (Jasco)
Gradientenformer	LG-980-02(Jasco)
Injektionsventil	Rheodyne RH7725 mit 20 µL Injektionsvolumen
Säule	120-5 RP-18, 250 x 4 mm, 5 µm (Macherey & Nagel)
Mobile Phase	Methanol/Acetonitril/Dichlormethan/n-Hexan A:(10:85:2,5:2,5) und B:(10:45:22,5:22,5) 0-40 min. Gradient 100% A zu 100% B, 40-60 min. 100% B (isokratisch)
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Detektor (DAD)	Photodiodenarraydetektor SPD-M6A, 380-550 nm (Shimadzu)

3.2.4.2 Biotransformation, Extraktion und GC-Analytik

Die Biotransformationsansätze wurden mit 1,5 mL Phosphatpuffer, 1 µg Gesamtzellprotein (Zelllysat) und 10 µL einer 20 mM NADPH-Lösung in 4 mL-Vials durchgeführt.

Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe des internen Standards BHT (50 µg) mit gleichem Volumen Pentan/Ether-Lösungsmittelgemisch durch 10minütiges Schütteln extrahiert und anschließend bei 4000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde über Natriumsulfat getrocknet und on-column injiziert.

Die chromatographische Trennung wurde mittels GC-FID Satochrom (Sato) durchgeführt. Detailliertere Informationen sind der Tabelle 3.16 zu entnehmen.

Tabelle 3.16: GC-FID

Gaschromatograph	Satochrom (GC-O)
Injektor	on column bei 40°C
Trennsäule	SolGelWax20, 30 m x 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	FID, 250 °C
Detektorgasgase	H ₂ , (50 kPa), Luft (100 kPa)
Trärgase	H ₂ , Vordruck: 50 kPa, Fluss: 3,3 mL min. ⁻¹
Datenaufnahme	Chromcard Version 1.21 (CE Instruments)
Temperaturprogramm	40°C (2 min.), 3°C min. ⁻¹ bis 240 °C (10 min.)

Die Identifizierung der Verbindungen wurde gaschromatographisch über einen Vergleich mit Referenzsubstanzen durchgeführt, die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard BHT. Zusätzlich wurden nach der GC-MS-Analyse die Massenspektren mit einer Spektrenbibliothek verglichen.

Tabelle 3.17: GC-MS

Gaschromatograph	GC 8000 (Fisons, GC-MS)
Injektor	on column bei 40°C
Trennsäule	ZB-Wax, 30 m x 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	MD 800 (Fisons)
Temperaturen	Ionenquelle: 200°C, Interface: 230°C, Quadropol: 100°C
Ionisation	Elektronenstoßionisation 70eV
Massenbereich	m/z 33-300
Trärgase	He, Vordruck: 50 kPa, Fluss: 3,1 mL min. ⁻¹
Datenaufnahme	Xcalibur Version 1.19 (Thermo)
Temperaturprogramm	40°C (2 min.), 3°C min. ⁻¹ bis 240 °C (10 min.)

4. Ergebnisse

4.1 Das Cytochrom P450 Monooxygenase-System (CyP450)

4.1.1 Stammscreening pinentransformierender Pilze

In vorangegangenen Arbeiten wurden verschiedene Basidiomyceten und Ascomyceten bezüglich ihres Potentials zur Oxidation von α -Pinen zu Verbenol bzw. Verbenon untersucht. Die Ausbeuten an Verbenol/Verbenon wurden unter Einsatz von Submerskulturen, Hochzelldichteansätzen und lyophilisiertem Mycel miteinander verglichen, wobei der Basidiomycet *P. sapidus* (*P. sapidus*) das größte Potential zeigte. Die Ausbeuten übertrafen jedoch in keinem Fall einen Wert von 155 mg L^{-1} (*E*)-Verbenol und 60 mg L^{-1} Verbenon (Hardebusch, 2006). Da die bakterielle CyP450_{cam} aus *Pseudomonas putida* selektiv α -Pinen zu Verbenol oxidiert (Bell *et al.*, 2003), wurden hier CyP450 Monooxygenasen des Basidiomyceten mit der Oxidation des Monoterpens in Verbindung gebracht.

4.1.2 Molekularbiologische Identifizierung von *P. sapidus*

Aus dem Myzel des submers kultivierten Stamms DSMZ 8266 wurde die DNA isoliert und diese in verschiedenen Verdünnungen als Template in einer PCR mit den spezifischen Primern 4813 und 4814, abgeleitet von der V6-Domäne der kleinen Untereinheit (SSU) der mitochondrialen rRNA-Gene, eingesetzt (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Spezifische Primer zur Amplifikation der V6-Domäne

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
4813	V6U	5'>TTA GTC GGT CTC GGA GCA<3'	56°C
4814	V6R	5'>TGA CGA CAG CCA TGC AAC<3'	56°C

Das amplifizierte PCR-Produkt wurde anschließend zwischenkloniert und sequenziert. Die ermittelte V6-Sequenz zeigte über die Gesamtlänge von 179 bp den geringsten E-Wert von $1,4^{-15}$ zu *P. sapidus* (Tab. 4.2; Accession number EMBL-EBI AF091905).

Tabelle 4.2: Ergebnis der Datenbankrecherche (FASTA-Algorithmus) der V6-Sequenz aus *P. sapidus* (Pearson, 1990)

	Accession number	Quelle	Länge [bp]	Homologie [%]	E-Wert	Literatur
1	AF091921	<i>P. sapidus</i> , SSU	179	91,55	1,4 ⁻¹⁵	Gonzalez und Labarere, 2000
2	AF091920	<i>P. sajor-caju</i> , SSU	173	92,09	9,3 ⁻¹⁵	Gonzalez und Labarere, 2000
3	AF091918	<i>P. pulmonarius</i> , SSU	173	92,09	9,3 ⁻¹⁵	Gonzalez und Labarere, 2000
4	AF091917	<i>P. ostreatus</i> , SSU	178	90,85	1,2 ⁻¹⁴	Gonzalez und Labarere, 2000

Dieser Wert beschreibt die Anzahl der zufälligen Alignments, die innerhalb dieser Datenbank zu finden sind (Tab. 4.2).

Das Alignment zeigt die Sequenz mit einer Länge von 179 bp im Vergleich zu den Sequenzen aus *P. sapidus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* und *P. sajor-caju* (Abb. 4.1).

<i>P. sapidus</i>	GTTATTTAATACGACA-ATACGCGTATAACCTTACCAG-ACCTTGCATATCTAGCTCTTT	58
<i>P. ostreatus</i>	GTTATTTAATACGACA-ATACGCGTATAACCTTACCAG-ACCTTGCATATCTAGCTCTTT	58
<i>P. pulmonarius</i>	GTTATTTAATACGACA-ATACGCGTATAACCTTACCAG-ACCTTGCATATCTAGCTCTTT	58
<i>P. sajor-caju</i>	GTTATTTAATACGACA-ATACGCGTATAACCTTACCAG-ACCTTGCATATCTAGCTCTTT	58
DSMZ 8266	GTTATTTAATACGACATATACGCGTATAACCTTACCAGTACCTTGCATATCTAGACGTCT	60
	*****	*
<i>P. sapidus</i>	TTATTTTTTTCATTTAATTTGAGTGAGTATATTTTAAACTTTTTTTTAAATAATACGC	118
<i>P. ostreatus</i>	TTATTTTTTTCATTTAATTTGAGTGAGTATATTTTAAACTTTTTTTT-AAAATAATACGC	117
<i>P. pulmonarius</i>	TTATTTTTTT-----AATTTGAGTGAGTATATTTTAACTTTTTTTG-AAAATAATACGC	112
<i>P. sajor-caju</i>	TTATTTTTTT-----AATTTGAGTGAGTATATTTTAACTTTTTTTG-AAAATAATACGC	112
DSMZ 8266	TT-TTATTTTTGTGTAATTTGAGTGAGTATATTTTAAAGTTTTTTTTTAAATAATACGC	119
	** * * * *	*****
<i>P. sapidus</i>	AGATACAGGTGTTGCATGGC	138
<i>P. ostreatus</i>	AGATACAGGTGTTGCATGGC	137
<i>P. pulmonarius</i>	AGATACAGGTGTTGCATGGC	132
<i>P. sajor-caju</i>	AGATACAGGTGTTGCATGGC	132
DSMZ 8266	AGATACAGGTGTTGCATGGC	139

Abbildung 4.1: DNA-Sequenz der V6-Domäne des mitochondrialen rRNA-Gens. Stamm DSMZ 8266 im Vergleich mit *P. sapidus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* und *P. sajor-caju*, ClustalW (Higgins et al., 1994)

4.1.3 Induktion und RNA-Isolierung

Zur Enzyminduktion wurde täglich 1 mmol L^{-1} (+/-) α -Pinen zur Submerskultur von *P. sapidus* hinzugegeben und die Produktbildung mittels Gaschromatographie analysiert (Abb. 4.2).

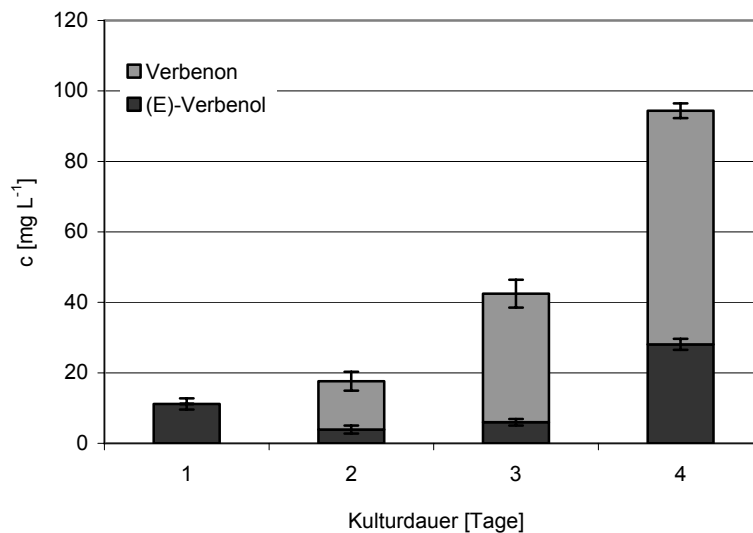


Abbildung 4.2: Biotransformation von α -Pinen in Submerskultur von *P. sapidus*. Produktbildung von (*E*)-Verbenol und Verbenon über eine Kulturdauer von vier Tagen (blindwertbereinigt)

Nach einer Kulturdauer von drei Tagen nahm die Bildung von (*E*)-Verbenol und Verbenon exponentiell zu. Hier waren in Summe 42 mg L^{-1} zu detektieren, wobei das gebildete (*E*)-Verbenol autoxidativ oder enzymatisch zu Verbenon weiteroxidiert wurde. Nach vier Tagen stieg die Bildung weiter bis auf 94 mg L^{-1} an. Am dritten und vierten Kulturtag, zum Zeitpunkt der höchsten Produktbildung, wurde die Gesamt-RNA aus den induzierten und aus parallel geführten, nicht induzierten Kulturen isoliert und diese mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegel- und Kapillargelelektrophorese analysiert (Abb. 4.3).

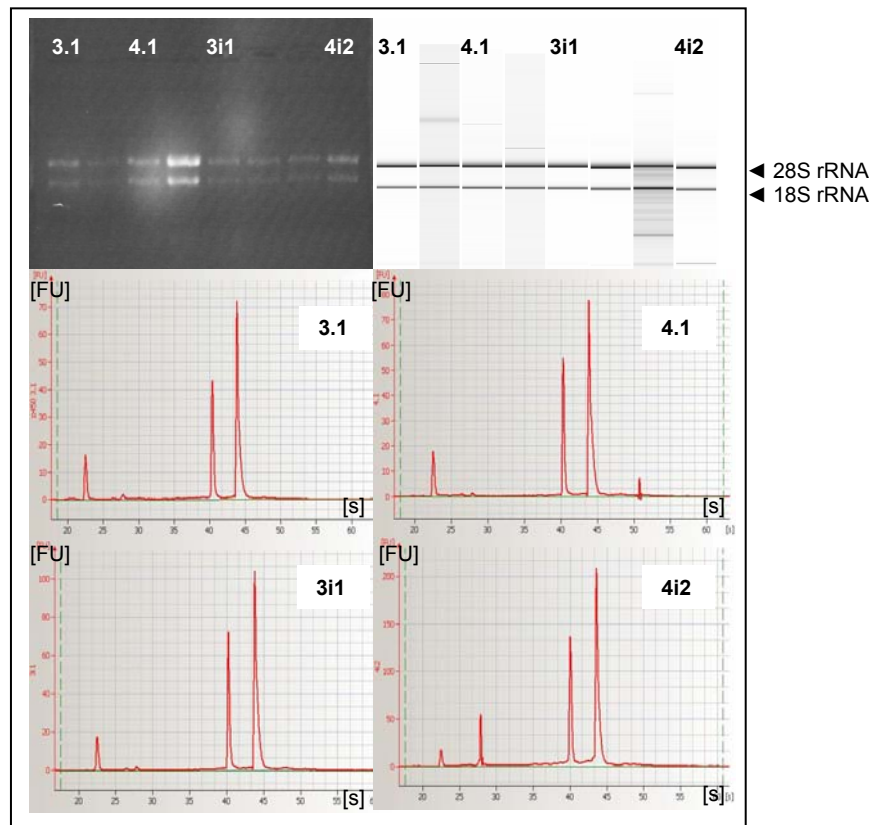


Abbildung 4.3: Gesamt-RNA aus *P. sapidus*. Denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel, virtuelles Agarosegel und Elektropherogramme der kapillargelelektrophoretischen Qualitätskontrolle, FU: Fluoreszenzeinheiten (*fluorescence units*), s: Retentionszeit in Sekunden, 3.1: Tag 3, Probe 1 (nicht induziert); 4.1: Tag 4, Probe 1 (nicht induziert); 3i1: Tag 3, Probe 1 (induziert); 4i2: Tag 4, Probe 2 (induziert); Bioanalyzer 2100 (Agilent)

Ausgeprägte 18S- und 28S-rRNA-Banden lassen auf einen repräsentativen Querschnitt von mRNA-Kopien schließen. Das virtuelle Agarosegel der kapillargelelektrophoretischen Analyse zeigt das gleiche Ergebnis wie das denaturierende Formaldehyd-Agarosegel, jedoch sind hier in einigen Proben Verunreinigungen durch degradierte RNA festzustellen.

Die Elektropherogramme der Proben 3.1 (Tag 3, nicht induziert), 4.1 (Tag 4, nicht induziert), 3i1 (Tag 3, induziert) und 4i2 (Tag 4, induziert) zeigten keine Degradierung der Gesamt-RNA. Diese Proben wurden für die cDNA-Synthese verwendet. Die Proben 4.1 und 4i2 zeigten durch zusätzliche Peaks tRNA-Anteile. Durch Reverse Transkription wurden die Erststrang-Kopie synthetisiert und anschließend die Gesamt-cDNA amplifiziert (s. Kapitel 3.2.2.2).

4.1.4 Subtraktive cDNA-Synthese

Aus der Gesamt-cDNA wurde unter Anwendung des PCR-Select cDNA Subtraction Kits (BD Clontech) subtraktive cDNA-Bank synthetisiert (Cao *et al.*, 2004).

Nach verschiedenen Reinigungsschritten wurde die Gesamt-cDNA mit dem Restriktionsenzym Rsa I geschnitten, erneut chromatographisch gereinigt und auf diese Weise für die Adapterligation vorbereitet. Durch diese Restriktion entstanden Fragmente mit einer Länge von 300-1000 bp und klebrigen Enden (*sticky ends*) mit definierten Überhängen, so dass Adapter ligiert werden können (Abb. 4.4).

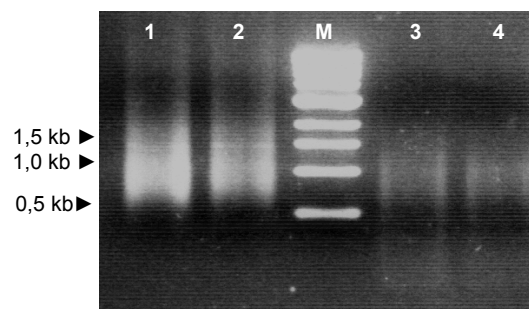


Abbildung 4.4: Rsa I-Verdau der Gesamt-cDNA aus induzierter Kultur. Kontrolle vor (Spur 1 und 2) und nach der Restriktion (Spur 3 und 4), Spur M: Marker

Nach zwei subtraktiven Hybridisierungsschritten wurde die verdünnte cDNA in einer anschließenden *Nested* PCR erneut amplifiziert, wobei der Hintergrund reduziert und die subtraktive cDNA angereichert wurde (Abb. 4.5).

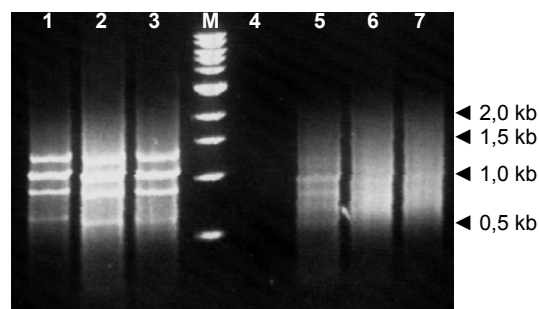


Abbildung 4.5: Subtraktive cDNA aus *P. sapidus*. Positivkontrolle (Spur 1, 2 und 3) und *P. sapidus* (Spur 5, 6 und 7), Spur 4: leer, Spur M: Marker

Der Vergleich mit der Positivkontrolle zeigte im Agarosegel, sowie auch in der Kapillargelelektrophorese eine Verteilung der subtraktiven cDNA als charakteristischen „Schmier“ mit wenigen ausgeprägten Banden (Abb. 4.6).

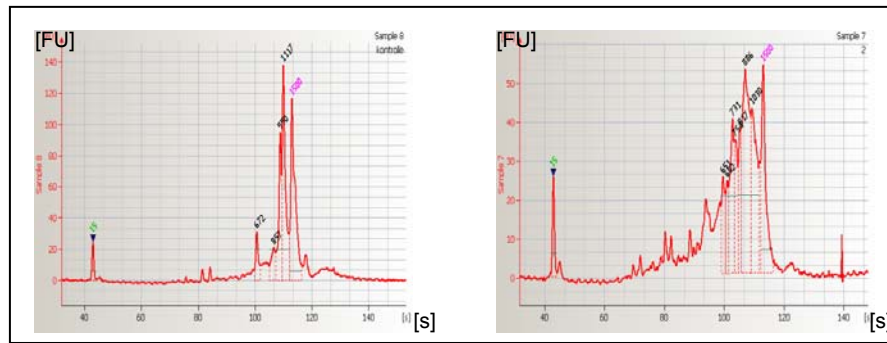


Abbildung 4.6: Subtraktive cDNA. Positivkontrolle (links) und *P. sapidus* (rechts)
Elektropherogramme der kapillargelelektrophoretischen Qualitätskontrolle,
Bioanalyzer 2100 Agilent

In Korrelation zu den ausgeprägten Banden im Agarosegel waren hier in der Positivkontrolle und in der subtraktiven cDNA drei deutliche Peaks nach einer Retentionszeit von 100, 110 und 115 Sekunden zu beobachten. Der Vergleich mit der Positivkontrolle bestätigte die erfolgreiche Synthese der subtraktiven cDNA (s. Kapitel 3.2.2.3).

4.1.5 Isolierung von cDNAs neuer CyP450 Monooxygenasen

Nach der gezielten Anreicherung der cDNAs von Monooxygenasen (EC 1.14.14.1 u. a.) durch subtraktive cDNA-Synthese wurden diese und die Gesamt-cDNA nach neuen CyP450 cDNAs durchsucht. Unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide wurde ein umfassendes PCR-Screening durchgeführt.

4.1.5.1 Sequenzalignments und Primerableitungen

Anhand eines Alignments bekannter CyP450 Monooxygenase-Sequenzen aus den Basidiomyceten *Lentinula edodes*, *Coprinopsis cinerea* und *Agaricus bisporus* wurde die konservierte Region der Hämbindestelle identifiziert und hiervon unter Berücksichtigung der *Codon usage* von *P. sapidus* (kazusa.or.jp/codon; Nakamura *et al.*, 2000) degenerierte *Forward*- und *Reverse-Primer* abgeleitet (Abb. 4.7 und Tab. 4.3). Neben der Hämbinderegion waren weitere charakteristische Domänen zu erkennen (Akiyama *et al.*, 2002), wobei die Membranbinderegion, der Prolin-reiche Abschnitt und die Mäanderregion allerdings weniger hoch konserviert waren.

	Membranbinderegion	Prolin-reiche Region	
<i>Le.CYP2</i>	MMYTAFFGLLAVATLALIGLVGIYRGRQQPYTAAGSCPPGPK-----VAIMPTHDAWV		53
<i>C.cinerea</i>	-MTTSSSIFAGLGCLLVASIIYFR-KFKANPARAHLPPGPKPIVVLGNVKDLRAKELWL		58
<i>A.bisporus</i>	---MPILSLARDILFISLCGLIYRIFRNRRNRLPLPPGLLRWPILGNALSMPLTYAHI		56
	::	::	::
<i>Le.CYP2</i>	EYKKGWNDYG-DLIYLSER--NTLITNKSEVAMDLEKRARIYSR-AMTPIMKLCGGED		109
<i>C.cinerea</i>	PAMDWAKQYG-DITYLHVFGQGLTFINSLESASDLEKRGMYADKPQFTMVCELCNCKN		117
<i>A.bisporus</i>	YYKHLGNKLGSKFIYLEAVQPFLIINDYRVAKDLEERSAIYSRP-QPFMSTEVIGLKR		115
	. . . * . : **	: * . . * ****: * . : :	: . : : . :
<i>Le.CYP2</i>	ILSLERYSEKWRKDRRVFQQTFRRAANSRFYSAQYNKIH-TFLRQLLTPDDFMEHMLRL		168
<i>C.cinerea</i>	MVAFTPYGEQSKRQRRMLMHKAFAPARI PDYHPLMESSTN-LFLRNVIASPADYIGHVRRY		176
<i>A.bisporus</i>	FFLLMPYGDIIWRNHRVFRQYDFPKYLPRDQEQQLNFIRKSLLPNLFIAPEEAHEHVANC		175
	::	::	::
<i>Le.CYP2</i>	SQALVYKALYGLDVPD-EDPLAKKAVEIDTLG-QALLPGAFFAYERFPFLRFMPSPWFP-		225
<i>C.cinerea</i>	SGSLTLNIVYGYEVTSNEDYLLMAEECVGILANEIASAGGVWAVDVMPLAKIPKWAEG		236
<i>A.bisporus</i>	IGGFILSIVYGLPVKTRHDLRVFAEKTFNDLA--ASTAPGKYLVNIIIPQLQYLPDWF-		232
	. : . : ** * . . *	* : . . * : : * * : * . *	
<i>Le.CYP2</i>	--GCRFKRTAIQGRSVKEVDTI PFDIAMAHLSKGTG-----VSPIAELAMRKPQDIKAI		278
<i>C.cinerea</i>	LPGMSFKRKARKWKKMMEDWVDGPFYEVKNTMKSQYKQSFCSLLDDESISQTEHFEF		296
<i>A.bisporus</i>	--GTEFKRVALKTAEELDKREEPYQAVLIAMVGHVVQNCLVSDNVEKLRNAPDFEDRIV		290
	* ** * : . . . *	* : : : . . : . .	
<i>Le.CYP2</i>	KAMGTVS--YLASADTTMSSISSFLLMTCQNPDIQAKGRDEIERVIGTDRLPTEFDRQSL		336
<i>C.cinerea</i>	DLKWTANSMYAASIDTTITSVAHFLAMMKHPEVLKKAQHEIDTVVQDRLPTFSDRKS		356
<i>A.bisporus</i>	DVKEVARTIFGAGFETTTGVIMTFVLAMLLNNDVQLQAQSEIDAVLGPRLPTFSDLS		350
	. . . : * . ** : * : * * : : : : : ** : * : * : * * * . * . *		
<i>Le.CYP2</i>	PYVEAIYREVMRLHPALPLGLPHVSIEDDFYRGYHLPKGCVVIPNIWAMNRDPDVPYTEPD		396
<i>C.cinerea</i>	PYVEAVLSETWRWASPVLSPHKLTEDDVYRGMYPKGSIFANIWAMTRDERIFPDPE		416
<i>A.bisporus</i>	PYFSAVIKEVLRWNPIGPIGIPHATTNEDEYDGYIIPKDCIVVSNIIYAMLHDENIFPDPE		410
	** . . * : * . * . * : : * * : * * * : * * : * * : * * : * * : * * : *		
		Mäanderdomäne	
<i>Le.CYP2</i>	RFLPERYS-ESPTGPFESI-NNIYAFGFGRRVCAGRHMAMENTIWLTIASVLATFTLGKAK		454
<i>C.cinerea</i>	TFNPERYLNMDPETKKQD-PRNFIFGFGRRLLCPGNHIVDASLWLLVVRMMATLDISTPV		475
<i>A.bisporus</i>	KFDGPRFMKNGTTINDLLNPIDVYFVGFGRVCPGSHLMSMLEITAASILCLFDILPAL		470
	* * * : . . .	***** : * * * : : : . : : : .	
<i>Le.CYP2</i>	DGKGNEIDIPGEYT-DQFFRHPKPYRSSII PRSALARELVLATDAE----		499
<i>C.cinerea</i>	DEKGNADIVPVFD-NPIFRTPNPFPCDMRPRSEKAVNLIRQYADPRASA		524
<i>A.bisporus</i>	DAQGKPIDVVPFTPASITSHPLPFKFNVS PRKGDVEGLLSEYMNVEYA		520
	* : * : * : : : * * : . : * * : : :		
		Hämbinderegion	

Abbildung 4.7: Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener CyP450 Monooxygenasen aus Basidiomyceten. Identifizierung der homologen Sequenzen, *Lentinula edodes* (*Le.CYP2*, Q8J2V7), *Coprinopsis cinerea* (*C.cinerea*, O74643) und *Agaricus bisporus* (*A.bisporus*, Q8WZH5), ClustalW

Als gegenläufige *Primer* wurden die Oligonukleotide 3768, 3769, 8444, 8445, 8821 und 1473 die von den bei der cDNA-Synthese verwendeten universellen Adapterregionen SMART III und CDS III abgeleitet wurden, verwendet (Tab. 4.3).

Tabelle 4.3: Primer zur Amplifikation CyP450-spezifischer Fragmente

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
1471	PSAP450 for 2	5'>GTT TCG G(ACT)C G(AC)C G(GC)A TTT GCC <3'	67,7°C
1472	PSA P450 for 3	5'>GC(AC) CG(GC) ATT TGC CCC GGC <3'	63,1°C
1474	PSA P450 for 1	5'>TTT CGG (ACT)CG ACG (GC)AT TTG CC <3'	62,6°C
4752	PSAP45072rev	5'>CCG GGG CAA AT(AG) CG(AGCT) CGA CCG<3'	72,1°C
4753	PSAP45072rev2	5'>CCG GGG CAA AT(AGCT) CG(AGCT) CG(AGCT) CCG<3'	73,0°C
4754	PSAP45080rev	5'>GGG CAA AT(AG) CG(AGCT) CGA CCG AAA CCG<3'	78,1°C
4755	PSAP45080rev2	5'>GGG CAA AT(AGCT) CG(AGCT) CG(AGCT) CCG AAA CCG<3'	79,0°C
9730	P450subfor64ges	5'>CAA TCA CAT CCT TGG AAG TAT CA<3'	64,0°C
9729	P450subrev64ges	5'>CGA CCC CAG GTT CAT GGC TA<3'	64,0°C
8421	P450_3Hämfor60	5'>GGT CGA CGC ATT TGC CCC <3'	60,0°C
8422	P450_3Hämrev60	5'>GGG GCA AAT GCG TCG ACC<3'	60,0°C
5045	P450_3for60	5'>GCA GTG GTA TCA ACG CAG AG<3'	62,5°C
5046	P450_3rev60	5'>GGC TTA GGT TGA AAT CTC ATG G<3'	60,8°C

Dieser konservierte Bereich ermöglichte auf diese Weise den Zugang zu neuartigen CyP450-Monooxygenasen auf molekularbiologischem Wege.

4.1.5.2 PCR und *Primer Walking*

Im PCR-Screening mit Gesamt-cDNA entstanden in Abhängigkeit von den verwendeten Primerkombinationen zahlreiche Amplifikate. Aufgrund der Verwendung universeller Primer, die an jede cDNA-Kopie binden, bildeten sich unspezifische PCR-Produkte (Abb. 4.8).

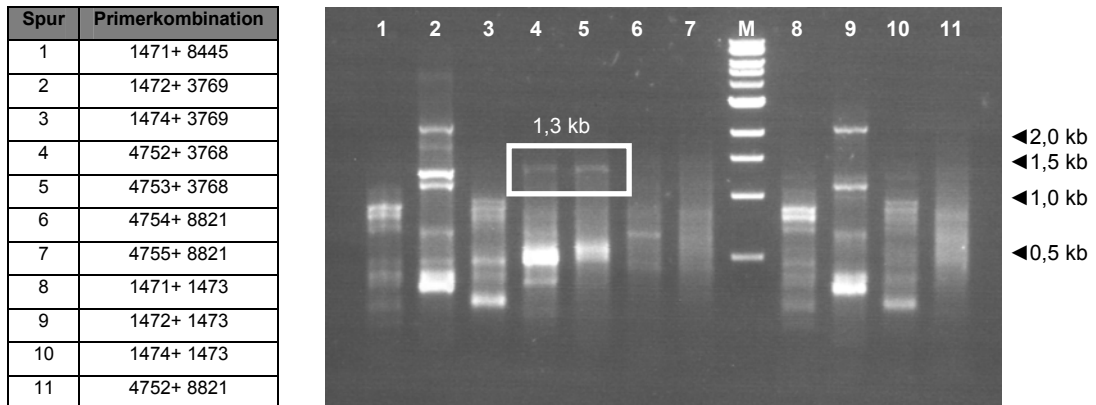


Abbildung 4.8: PCR-Screening zur Amplifikation CyP450-spezifischer Fragmente. Auftrennung der PCR-Produkte aus unterschiedlichen Primerkombinationen durch Agarosegelelektrophorese, cDNA-Fragmente von CyP450 Monooxygenasen (Spur 4 und 5), M: Marker

Über Datenbankvergleiche mit bekannten CyP450-Sequenzen anderer Basidiomyceten wurde die Länge potentieller Cy450-Fragmente abgeschätzt. Von der Hämbindestelle zum C-Terminus waren es etwa 80 Aminosäuren (240 bp), zum N-Terminus sind es 430 Aminosäuren, also etwa 1,3 kb. Die hervorgehobenen Ansätze zeigten die PCR-Produkte mit der erwarteten Fragmentgröße. Diese Banden wurden isoliert, in *E. coli* zwischenkloniert und sequenziert (Abb. 4.8).

Anhand von FASTA-Datenbankrecherchen wurde beide Amplifikate zweifelsfrei als Fragmente von CyP450 Monooxygenase cDNAs identifiziert (Tab. 4.4). Durch *Primer Walking* wurden die Gesamtsequenzen der cDNAs von CyP450_1 (*Primer* 9729 und 9730) und CyP450_3 (*Primer* 5045 und 5046) ermittelt, amplifiziert und diese anschließend in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert.

```

CGACCCAGGTTATGGGTAGCCAGAATATGTACGCTATCGGACTGACCAGTCTCGCTATCGCAGCCTTGCTGGTGGTTGTCA
GACATTATGCAAACAACAGCCTCTCTCTGCTTTCCTCCCGGCCAAAGCCACTCCCGTCTCGAAATGTGCTTGATATA
CCTAGCAAAGCCCTTGGGAAGACCTACAACGACTGGTTCAAGGTCTACGGCGACATGATCTATGAACATCATGGGCAATC
TATTCTGGTTCTAGGGTCAGTCCGAGCGCATCAGGACCTGCTCGAGAACGTTCTGTGAAGTACTCAGACCGTCCACGAATGA
CCATGCTCAATGAGCTCATGGGCTGGGACTGGTGTTCGGCCTCATGCCTTACTGTACATCATGGCGGAAACAAGAAAGCTG
TTCTACGACCAAGTTTCAAACCAATTTCTCCAGTTTAGGCCAATACAATCAACCACACTCACAAGTCTTGGGAAACCTTCT
GGAGTCGCCCGGACAATTTCTTACAACACATTCGCCTATTTTTTCGCGAGGCACTATCCTGGAGGTACCTACGGAATCAAGTCT
CTAGCTACAACGATCCTTATGTGACCAACGCAGAACAGTGTAGCCGCGTTGGCTAGTGCCAGTATAACCGGTGCTTTTTTG
GTAGACACGTTCCCATCTTGAAGCACATTCATTTGGTTCGCCGGCGCGGGTTTCAAACGTAAAGCCAAAGAGTGGGCAAA
GCTGTCTTACAACCTCGTTCACGGCCATTCATGTACAAGGAAGCTTTACGTCGAAGGAAGGCTCTTCCGTCAGCCGCGAG
CCAACATGCTGGAAGCTGCCCCAGAAGACAAACCAGATAATTACGAAGAGCTTGTTCGTAATGTGCCGCCATCTCGTTGCA
GCCGGCTCANACACAACAGTTTCGACCTTGCAGACCTTCTTCTAGCTATGGCCATGTTCCCAAGCCAGAAANAAGGCCCA
AGCGGAGATAGACGCCATCGTAGGGCACACACGCTTTCATCCTTCGCCGACCGCCAGTTCCTCCGTACCTTGAAGCATTGA
TTATGGAGATATCGAGATGGAACTGTCTCGCCCTTGCCTTACCCACGCGTCTACCTCCGATGACGAATACGATGGATAT
TTCATACCCAGGGCAGATTGTTATGGCCAATACCTGGGCTTGTGTAACGATCCGTCGTAACCCGACCCCTGACGACTT
CAATCCGGATCGGTTCTCATGGATGGCAAGATCAATCCAGAGGTTCTGTACCCCGTGATTTCTGTGTTCCGGTACGGTCGAC
GCGCCTGCCCGGACGTTTCTTCAGCCAGGATAACTTGTACAGTGCCTTACGGGTATCTTAGCTTCATTTTCTATCACTCCA
GCTCAAGACACACAGGGGAACGACATTCCTCTCAAGCGGAAATGAGCAACGGGTCATTATCATACCCCTCCCATTTAAATG
CAAGATTAACCCCGGACTGGCTACGACAGCAATGATTCACGAGCAACAGTCTTGAGTGAAACACCCGATCGTTGCA
AGTTTGTAGTACGGGAGAACCACCCAGAAATGATGGTATTGTGAATGTATGAATGTATTGTAGGCTCTCTTTGGTTG
ATAGGCTGTAGAGTATGAATGATACTCCAAGGAATGTGATTG

```

```

MASQNYAIGLTSIAAALLVVVRHYANKRLSLPFPKPLPVLGNVLDIPSKAPWKTYNDWFKVYGMIMYMNIMGQSIILVL
GSVERITDLLEKRSVKYSDRPRMTMLNELMGWDWCFGLMPYCTSWRKQRKLFYDQFQTNFLQFRPIQINHTHKFLGNLLESPD
NFLQHIRLFFAGTILEVYGIQVSSYNDPYVTNAEQCLAALASASIPGAFVDTFPIILKHIPLWFPAGFKRKAKEWAKLSYN
LVHGPFNATKEALRQKALPSAAANMLEAAPEDKPDNYEELVRNCAISFAAGSDTTVSTLQTFFLAMAMPFAQKKAQAEID
AIVGHTRFSPFADRPVLPYLEALIMEISRWNVTVSPALALPHASTSDDEYDGYFIPKGTIVMANTWALLNDPSVYVNPDDFNDR
FLMDGKINPEVRDPRDFVFGYGRACPRFRFSQDNLVSAVTGILASFSTIPAQDTQGNDIPLKAEMSNGLSYLPLFKCKITP
RTGYAEQLIRQSNSS*

```

Abbildung 4.9: DNA- und übersetzte Aminosäuresequenz der Monoxygenase CyP450_1 aus *P. sapidus*. Start- und Stoppcodon ist jeweils fettgedruckt, die konservierte Hämbinderegion ist unterstrichen

Die Monoxygenase CyP450_1 (AM408780) besaß ein offenes Leseraster von 1539 bp (Abb. 4.9) und laut Datenbankrecherchen eine maximale Homologie von 53% zu einer CyP450 Monoxygenase *Le.CyPfb* (AB116638) aus *Lentinula edodes*. Die übersetzte Sequenz bestand aus 513 Aminosäuren, das Motiv der Hämbinderegion wurde identifiziert. Das Protein wies ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 57,5 kDa auf (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html; Obenauer *et al.*, 2003).

Tabelle 4.4: Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der Monoxygenase CyP450_1

	Accession number	Quelle	Länge [bp]	Homologie [%]	E-Wert	Literatur
1	AB116638	<i>L. edodes</i> , <i>Le.CyPfb</i> P450	1910	53,45	1,1 ⁻³³	Hirano <i>et al.</i> , 2004
2	AJ271707	<i>A. bisporus</i> , CyP450 mRNA	1098	53,27	3,7 ⁻³¹	Eastwood <i>et al.</i> , 2001
3	Z82021	<i>A. bisporus</i> , CyP450 mRNA	932	56,68	1,4 ⁻²⁸	De Groot <i>et al.</i> , 1997
4	AY827553	<i>H. annosum</i> , CyP450 mRNA (HCY2)	1815	51,89	8,2 ⁻²⁹	-
5	DQ444268	<i>P. chrysosporium</i> , CyP450 mRNA (cyp64-1)	894	54,34	9,9 ⁻²²	Larrondo <i>et al.</i> , 2007

Das offene Leseraster der Monoxygenase CyP450_3 (AM411585) hatte eine ähnliche Länge. Es umfasste 1524 bp (Abb. 4.10) und zeigte die höchste Homologie (56%) zu der CyP450 HCY2 aus *Heterobasidion annosum* (AY827553), ebenfalls einem Basidiomyceten (Tab. 4.5).

```
GCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGGTAGCTGGGATTGACATTCACCCCGAAACATTC AACCGCGGGACC
TGCGATAATGATCCCTGTAGTCTTCTTCTTCTGCTCCCTATCGTTTCTTTCGCGTGGCGATGGCGGAAGATCGGCCATCGAG
AACGGTTCCTTCCCTCCGGGGCTCCAACAAGGTTTCTGCTAGGGAACGTGCAGGATATTC AAGGACTTTGCCCTTTGTCCAA
CTCACGCGCTGGGCAGCAGAGTATGGAGAAGTGGTGTGCTCAAGATTTTGAACCAGACCATGATCGTGTGAATAGCGGGCC
CGCTGTAAAAGAAATCATGGATAAGCAAGGTGCTTTCAGTGGAAATCGCCCCAAGCATAACCTGATCAAACGAGCCGAAGGCC
AATACCCCATATTTCTCCAACCTAGATGAACGCATCTTCAAGGGCAGTCGACGCGCTTATCACACTTTCTCCTACTAGCGAAGCC
ATCGCAAGCTATTTGGCGATGCAACAAGTTCGAGTATGCAAGGCTCATGCACGATATTGCTAGCTCTCCCGAGGACTTCATTCC
CCACATCAAACGCATGTCCACTTCGATCATGGTTACCTTCTTTACGGCAAACCGGTATCGGACTTCGGGGATAACAAGCATC
TGTTATACTTCGATGTATGAAGAAGTTCACCGAATTGACTGACCCATGGGCCCATCCGCTTTGGACATCATGCCGATTCTC
AAGCACGTTTCTGCGCTGGCGAGGTGGAAAGGTTTGTGCGAGGAGGCCAAACAATTGCGAGGAGCATTCTTTGACGATAT
TACGGACGACTTCGAAGCGAGATACCGCGCAGGGGAGCGTACTGGTTCGTTTCTGGAGAAGGTGCTAGATCACCCATAACT
TTGACATGACCATCGAGGAATTAGAGGTATGAGCCGCTGCTGATGGACGGCGGGTTCGAGACATCCGCGTCATATATCCAG
AACTTCATCCTTGGCGTGTGCTTGGCCATCCCGTGTGTCAGGATAAAGCTCAGGCGGAAATTGATCGAGTGGTGGCGAAGC
TATCCCAACCCTAGAGGACTTCGACGATTTACCCCTATCTGTCGCTCATCAAAGAGGTCATCCATCGCTTTCGGCTGCTGC
CCGGTGTGACCTCATATGGCTGCGAGGGACATTGCTACAAGGAACACCTCATCCAGAAAGGCGCAATCATCGTATGAAC
ACATGGGAAATTTCCATGATACTGAGGTATTCGAGAACCCGAGAAGTTTGAACCCAGAGAGGTACATTAAGTCGGAATATGG
TGTCAAAGACGGGGCGAGCTGATGATGATCAGAGATACGCTTTCGTTTCGGGCTGGTTCGACGATATCTGCCCCGGGGTGTAGA
TGGGTCAACGAACAATCGCCATCAACACCATGAATCTCTGCGGGCTTCAAATTCACCGACAAGACTGGCAATGCTCTATG
GACCTGGAGAATTACCATGCTGGCGCAGAACTTTCGCCAAATGCATTTCCCTGCGACATCAAAGTACGTGATCTAAACGGGC
GAAGCTCATGAAGAACCTACATGTATATGACTGCTTGAATACCATGAGATTTCAACCTAAGCCGAAT

MI PVVLLLLLPVIVFAWRWRKIGHREFLPPGPTRFLLGNVQDIPRTLFPVQLTRWAAEYGELVSLKILNQTMIVVNSGPV
KEIMDKQGVFSGNRPQAYLIKRAEGEYPIFSNLDERIFKGSRRAYHTFLTSEAIASYLPMQQVEYARLMHDIASSPEDFIPHI
KRMSTSIMVTLLYGKPVSDFGDNKHLLYFDAMKKFTELTDPWAHPPLDIMPILKHVPARWARWKLCEBAKQLRGAFFDDITD
DFEARYRAGERTGSFLEKVLDPNHFDMTIEEIRGMSRLMDGGVETSASYIQNFILALACHPACQDKAQAEIDRVIIGGERIP
TLEDFDDLPLYLRALIKEVHRFRPVLPGAVPHMAARDIRYKEHLIPEGAIIVMNTWGI FHDTEVFENPEKFDPERYIKSEYGVK
DGASSDGIRDLSFGAGRRICPGAEMGQRTIAINTMNLWAFKFTDRGTGKCSMDLENYHAGAE LSPNAFPCDIKVRDAKRKAL
IEETYMYMTA*
```

Abbildung 4.10: DNA- und übersetzte Aminosäuresequenz der Monoxygenase CyP450_3. Start- und Stoppcodon ist jeweils fettgedruckt, die Hämbinderegion ist unterstrichen

Die charakteristische Hämbinderegion wurde wie bei CyP450_1 ebenfalls identifiziert. Die übersetzte Sequenz der CyP450_3 verfügte über 508 Aminosäuren. Das Protein besaß ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 58,1 kDa.

Tabelle 4.5: Ergebnis der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der CyP450_3 Monoxygenase

	Accession number	Quelle	Länge [bp]	Homologie [%]	E-Wert	Referenz
1	AY827553	<i>H. annosum</i> , CyP450 mRNA	1815	56,27	2,6 ⁻¹⁴	-
2	AJ271708	<i>A. bisporus</i> , CyP450 mRNA partial	741	53,25	4,7 ⁻¹⁰	Eastwood <i>et al.</i> , 2001
3	AP007161	<i>A. orizae</i> , RIB40 Gen	2668010	55,34	2,3 ⁻⁰⁶	Machida <i>et al.</i> , 2005
4	Z82021	<i>A. bisporus</i> , CyP450 mRNA	932	54,73	2,6 ⁻⁰⁵	De Groot <i>et al.</i> , 1997

Der Sequenzvergleich auf Aminosäureebene der beiden Monooxygenasen zeigte nur eine geringe Homologie von etwa 26%, jedoch sind beide Hämbinderegionen hoch konserviert. Sie unterschieden sich in beiden Sequenzen lediglich in zwei Aminosäuren. Der Cysteinrest, der als Hämligand funktioniert, war in beiden Sequenzen vorhanden (Abb. 4.11).

CyP450_1	MASQNYAIGLTSIAAALLVVVRHYANKRLSLPFPFGPKPLPVLGNVLDIPSKAPWKTY	60
CyP450_3	---MIPVVLVLLLPVVFVWRWRKIGHR--ERFLPPGPPTRFLLGNVQDIPRTLFPVQL	54
	: : * * * . . . : * : : : : : * * * * . : * * * * * * . * :	
CyP450_1	NDWFKVYGDMIYMNIMGQSIILVLSVERITDLEKRSVKYSDRPRMTLNLMLGWDWCFG	120
CyP450_3	TRWAAEYGEVLVSLKILNQTMIVVNSGPAVKEIMDKQGVFSGNRPPQAYLIKRAEGEYPIFS	114
	. * * * : : : * . * : : : * . : : : : * . * : * * : : : . * * . :	
CyP450_1	LMPYCTSWRKQRKLFYDQFQTNFLQFRPIQINHTHKFLGNLLESPDNFLQHIRLFFAGTI	180
CyP450_3	NLDERIFKGSRRAYHTFLTSEAIASYLPMQVVEYARLMHDIASSPEDFIPHIKRMSTSIM	174
	: : * . . . : : : * * . : : : : . * * : * * : : : . :	
CyP450_1	LEVTYGIQVSSYNDPYVTNAEQCLAALASASIPGAF-LVDTFPILKHIPLWFFGAGFKRK	239
CyP450_3	VTLLYGKPVSDFGDNKHLLYFDAMKKFTELTDPWAHPPLDIMPILKHVPARW--ARWKGL	232
	: : * * * * . . . : : : : : * * . : * : * * * * : * : * :	
CyP450_1	AKEWAKLSYNLVHGPFNATKEALRQKALPSAAANMLEAAPEDKPDNYEELVRNCAAISF	299
CyP450_3	CEEAKQLRGAFDDITDDFEARYRAGERTGSFLEKVLDP--NHFDMTIEEIRGMSRLLM	290
	. : * * : * . . . : : * * : * * : * * : * : * * * . : : : :	
CyP450_1	AAGSDTTVSTLQTFFLAMAMFPEAQKKAQAEIDAIVGHTRFPSFADRPVLPYLEALIMEI	359
CyP450_3	DGGVETSASYIQNFILALACHPACQDKAQAEIDRVIGGERIPTLEDFDDLPLRALIKEV	350
	. * : * . * : * * : * * * * . * . * . * * * * * : * * * : * * * * * * * :	
CyP450_1	SRWNTVSPALPHASTSDDEYDGYFIPKGTIVMANTWALLNDPSVYPNPDDFNPDRFLMD	419
CyP450_3	HRFRPVLPGAVPHMAARDIRYKEHLIPEGAIIVMNTWGIHFDTEVFENPEKFDPERYIKS	410
	* : . * * * * * : * * * . : * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
CyP450_1	GKINPEVRDPR---DFVFGYGRACPCGRFFSQDNLYSAVTGILASFSITPAQDTQGNDI	475
CyP450_3	EYGVKDGASSDGIIRDITLSEFAGRRICPGAEMGORTIAINTMNLWAFKFT---DKTGKCS	467
	: . . : * * * * * * : * * : . . : * * : * * * * . * * :	
CyP450_1	PLKAEMSNGLSYPLPFKCKITPRTGYAEQLIRQSNSS---	513
CyP450_3	MDLENYHAGAELSPNAFPDCKIVRDAKRAKLIETMYMTA	508
	: * : * . * * * . :	

Abbildung 4.11: Alignment der Aminosäuresequenzen der CyP450_1 und CyP450_3. Homologie von etwa 26%, die konservierten Hämbinderegionen sind hervorgehoben, ClustalW

Die im Alignment angezeigten Hämbinderegionen FGAGRRICPG bzw. FGYGRRACPG wurden in beiden Sequenzen identifiziert. In der Tabelle 4.6 sind die Daten beider CyP450 Monooxygenasen aus *P. sapidus* zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Vergleich der Monooxygenasen CyP450_1 und CyP450_3

	CyP450_1	CyP450_3
Offenes Leseraster	1539 bp	1524 bp
Aminosäuresequenz	513	508
Hämbindestelle	FGYGRRACPG	FGAGRRICPG
Molekulargewicht	57,5 kDa	58 kDa
<i>Accession number</i>	AM408780	AM411585
maximale Homologie (Aminosäuresequenz)	39%	31%

Entgegen der geringen Sequenzhomologie von etwa 26% besaßen beide Enzyme etwa die gleiche Länge der Aminosäuresequenz, mit 57,5 bzw. 58 kDa ähnliche berechnete Molekulargewichte und eine hohe Übereinstimmung innerhalb der konservierten Region der Hämbindestelle. Hinsichtlich der geringen maximalen Homologie auf Aminosäuresequenzebene von 39% und 31% mit anderen bekannten CyP450 Monooxygenasen stimmten beide Enzyme ebenfalls überein.

4.1.6 Induktionsuntersuchungen mittels Realtime-PCR

Um einen Induktionseffekt durch Zugabe von α -Pinen feststellen zu können, wurde eine Realtime-PCR zur relativen Quantifizierung der Transkripte der Monooxygenasen CyP450_1 und CyP450_3 durchgeführt. Hierzu wurden repräsentative Fragmente der beiden Monooxygenasen mit einer Größe von etwa 180 bp sowie eines internen Standards, V6-Domäne der kleinen Untereinheit der mitochondrialen rRNA-Gene, aus der cDNA-Bank aus induzierter und aus nicht induzierter Kultur vergleichend amplifiziert und die C_t -Werte ermittelt (Abb. 4.12). Der Vergleich mit einem internen Standard, die Normalisierung der Expressionsergebnisse, hob die Varianz der Reversen Transkription und individuelle Probeneffekte wieder auf (Rasmussen, 2001). Der C_t -Wert (*threshold cycle*) ist der Schnittpunkt der sigmoidalen Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert (*threshold*) und beschreibt den Zyklus, an dem die erste signifikante Fluoreszenzzunahme detektierbar ist. Der Wert ist direkt abhängig von der Kopienzahl des Zieltranskriptes in der Zelle. Im Falle einer Reaktionseffizienz der PCR von 100% verdoppeln sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal.

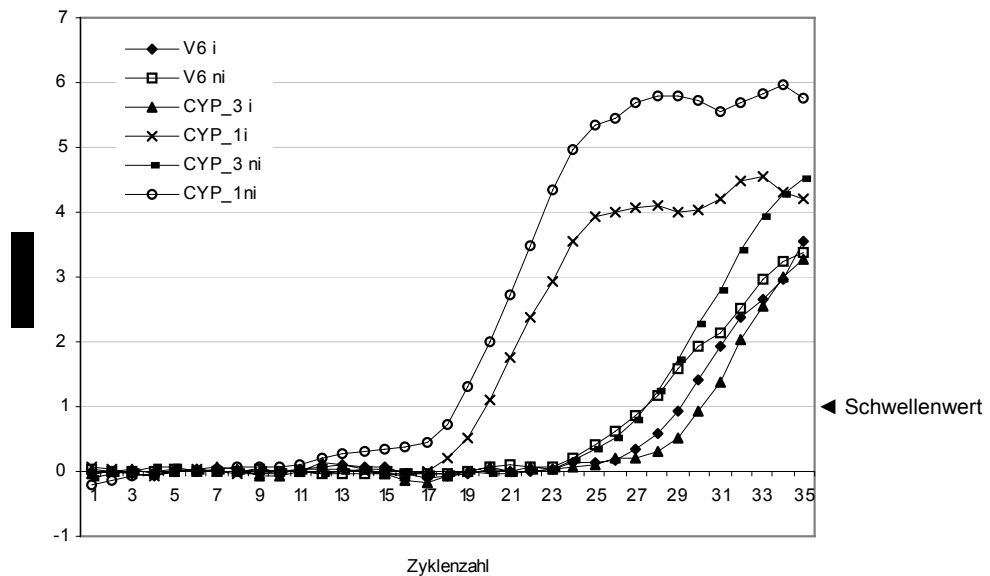


Abbildung 4.12: Amplifikationskurven der CyP450_1- und CyP450_3-Fragmente. V6: interner Standard, i: cDNA aus induzierter Kultur als Template, ni: cDNA aus nicht induzierter Kultur, Primer 4813 und 4814 (V6), 7022 und 7023 (CyP_1), 7024 und 7025 (CyP_3)

Der Schwellenwert entsprach dem Fluoreszenzwert 1. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) wurde über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt (Livak und Schmittgen, 2001). Die C_t -Werte der zu untersuchenden Transkripte (C_t Zielgen, CyP450) wurden auf den internen Standard (C_t Referenzgen, V6) normiert. Nach dieser Normierung wurde von den experimentell behandelten Proben (ΔC_t Behandlung, induziert) der C_t -Wert der Kontrolle (ΔC_t Kontrolle, nicht induziert) abgezogen.

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Behandlung} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Der relative Expressionsunterschied, normalisiert auf das Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, wurde als Ratio angegeben und beschreibt den Faktor, um den ein Gen stärker bzw. schwächer exprimiert wurde (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: C_t-Werte der Amplifikationen CyP450_1, CyP450_3 und V6, ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ und Ratio

	CYP_1i	CYP_1ni	CYP_3i	CYP_3ni	V6 i	V6 ni
C _t -Wert	19,35	17,96	29,53	26,74	28,42	26,47
ΔC_t	-9,07	-8,51	1,11	0,27	-	-
$\Delta\Delta C_t$	-0,56	-	0,84	-	-	-
Ratio	1,47	-	0,55	-	-	-

Bei der Monooxygenase CyP450_1 war im induzierten Ansatz das Transkript des Zielgens etwa 1,5fach stärker exprimiert als beim nicht induzierten Ansatz. Die Untersuchungen der CyP450_3 Monooxygenase zeigten das umgekehrte Ergebnis (Faktor 0,55).

Die Schmelzkurvenanalyse zeigte die Fluoreszenzänderung pro Zyklus aufgetragen gegen die Schmelztemperatur des PCR-Produktes. Die Hauptpeaks entsprachen den Schmelztemperaturen der spezifischen PCR-Produkte, kleinere Peaks bei niedrigeren Temperaturen der Bildung von Primer-Dimere (Abb. 4.13).

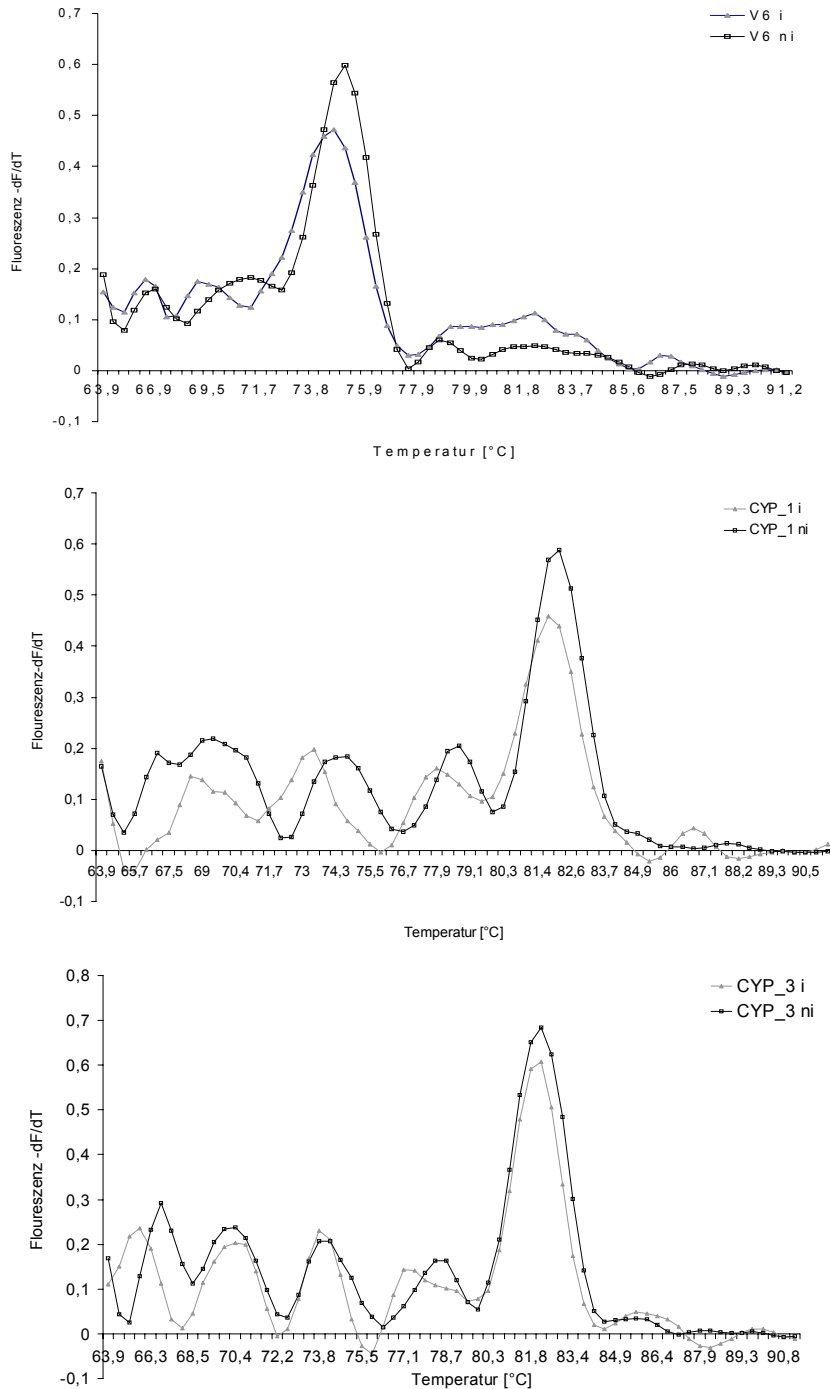


Abbildung 4.13: Schmelzkurven der PCR-Produkte V6, CyP450_1 (CyP_1) und CyP450_3 (CyP_3). V6: interner Standard, i: cDNA aus induzierter Kultur als Template, ni: nicht induziert

Trotz der software-untergestützten Primerkonstruktion (es.embnet.org/cgi-bin/primer3_www.cgi; Rozen und Skaletsky, 2000) kam es in allen drei Ansätzen zu einer Bildung von Primer-Dimere, wodurch das Fluoreszenzsignal der Amplifikationskurven verstärkt wurde. Die Hauptpeaks, die Schmelzpunkte der spezifischen PCR-Produkte CyP450_1, CyP450_3 und V6 aus induzierter und nicht

induzierter cDNA-Bank, stimmten jeweils überein. Es entstanden in beiden Amplifikationen die gleichen PCR-Produkte, auf die sich die C_T -Werte bezogen und somit miteinander vergleichbar waren.

4.1.7 Hypothetische 3D-Modelle der CyP450_1 und CyP450_3

Basierend auf den Röntgenstrukturdaten kristallisierter CyP450 Monooxygenasen wurden mit Hilfe des Programms SWISS-MODEL hypothetische, dreidimensionale Strukturmodelle (3D-Modelle) der Monooxygenasen CyP450_1 und CyP450_3 berechnet (Abb. 4.14 und 4.15).

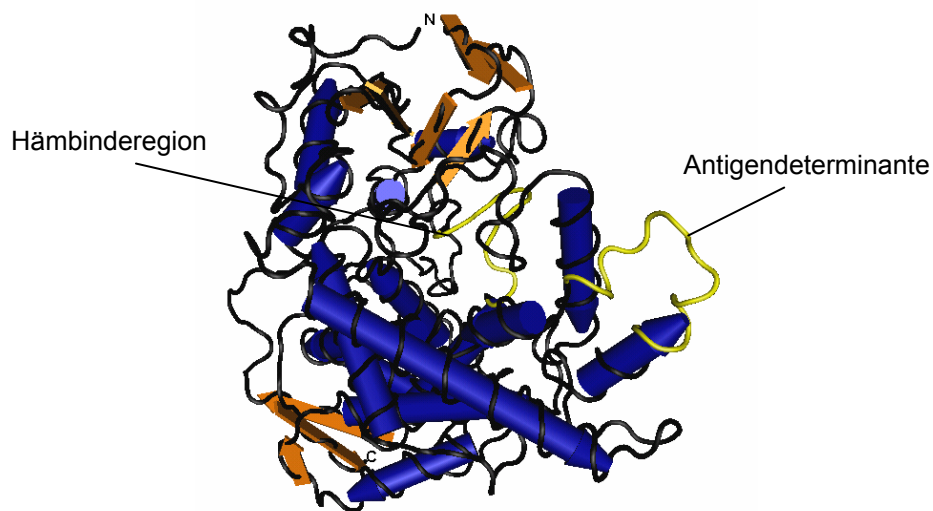


Abbildung 4.14: 3D-Modell der Monooxygenase CyP450_1. Hämbinderegion und Antigendeterminante sind hervorgehoben, SWISS-MODEL (Schwede *et al.*, 2003)

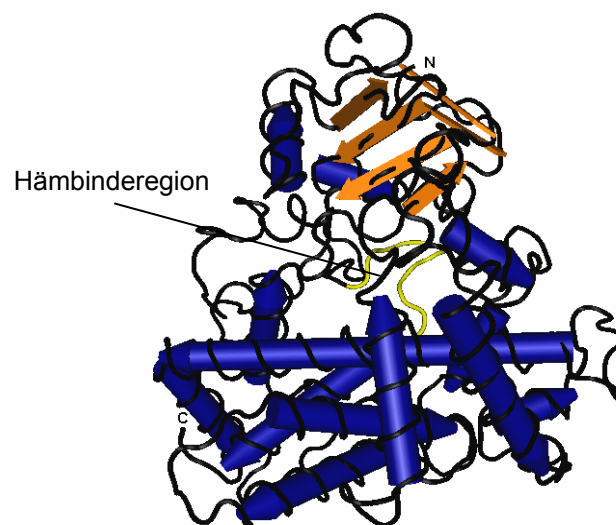


Abbildung 4.15: 3D-Modell der CyP450_3.
Hämbinderegion ist hervorgehoben, SWISS-MODEL

Die Monooxygenase CyP450_1 verfügte über 15 α -Helixstrukturen. Die neun β -Faltblattstrukturen finden sich entgegengesetzt am N- und am C-Terminus wieder. Die Monooxygenase CyP450_3 hingegen besaß sechs β -Faltblattstrukturen am N-Terminus und insgesamt 13 α -Helices. Beide Enzyme besaßen zentral lokalisierte, konservierte Hämbinderegionen mit Substratzugangstunnel. Die Antigen-determinante, die für die Synthese spezifischer, polyklonaler Antikörper gegen die Monooxygenase CyP450_1 herangezogen wurde, ist ebenfalls markiert (s. Kapitel 3.2.3.3).

4.1.8 Produktion synthetischer Antikörper

Anhand der 3D-Struktur wurde die exponierte Aminosäuresequenz CMLEAAPEDKPDNYE (MG: 1724,6; MALDI-TOF) als geeignete Antigen-determinante zur Produktion synthetischer, polyklonaler Antikörper ausgewählt (Abb. 4.14). Die Peptidsynthese, Konjugatherstellung und die Antikörperproduktion in Kaninchen erfolgten durch die Firma Biogenes GmbH (Wakamiya *et al.*, 1994). Ein ELISA-Test ergab einen IgG-Titer von 1:200000 (s. Kapitel 3.2.3.3). Der Antikörper wurde im immunologischen Screening nach exprimierenden Klonen mittels *Western Blot* eingesetzt (s. Kapitel 4.1.9).

4.1.9 Klonierung und heterologe Expression in *P. pastoris*

Für die heterologe Expression des CyP450_1-Enzyms wurde die cDNA aus dem Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO in den Expressionsvektor pPIC3.5K (Invitrogen) umkloniert (s. Kapitel 3.1.6; Abb. 4.16).

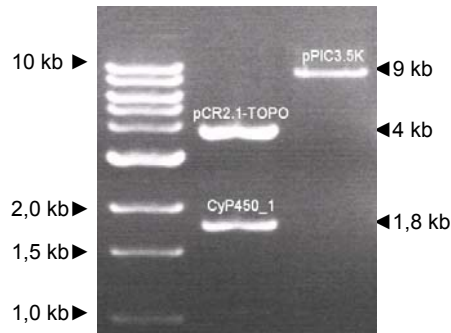


Abbildung 4.16: Auftrennung der Klonierungselemente im Agarosegel. Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO, Insert CyP450_1, linearisierter Expressionsvektor pPIC3.5K

Unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen BamH I und Not I wurde der Expressionsvektor asymmetrisch linearisiert und das Insert CyP450_1 aus dem Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO geschnitten. Nach der Ligation von linearisiertem Vektor (pPIC3.5K) und Insert entstand der Expressionsvektor pPIC3.5KCyP450_1 (Abb. 4.17).

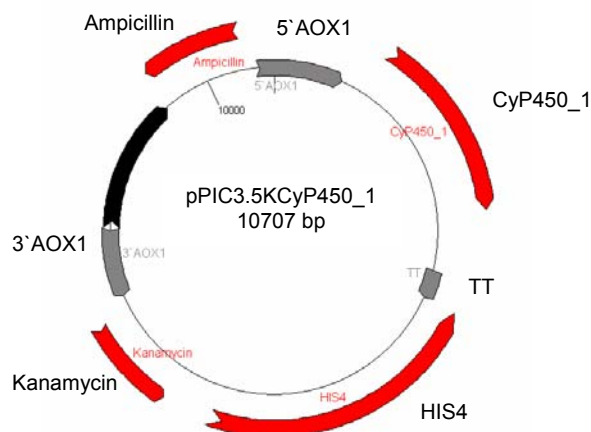


Abbildung 4.17: Vektor pPIC3.5KCyP450_1 für die Expression der Monooxygenase CyP450_1 in *P. pastoris*. 5' AOX1: Promotorregion, CyP450_1: cDNA der CyP450_1 Monooxygenase; TT: Transkriptionsterminationssignal, HIS4: Histidinoldehydrogenasegen, Kanamycin: Kanamycinresistenzgen, 3' AOX1: Rekombinationsregion, Ampicillin: Ampicillinresistenzgen

Nach der Vermehrung in *E. coli* wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen Xcm I bzw. Bgl II linearisiert, durch Elektroporation in *P. pastoris* transformiert und über homologe Rekombination ins Genom des Wirtes *P. pastoris* integriert (Abb. 4.18). Aufgrund einer Deletion im Gen *his4* handelte es sich bei den Laborstämmen von *P. pastoris* um histidin-auxotrophe Mutanten, die über histidinfreie Nährmedien selektiert werden (Cereghino und Cregg, 2000). Es kann dabei zu spontanen Mehrfachinsertionen kommen, welche mit einer von der Kopienzahl abhängigen Steigerung der Proteinproduktion einhergehen. Diese Klone ließen sich anhand ihrer Resistenz gegenüber steigenden Konzentrationen des Antibiotikums Geneticin im Kulturagar identifizieren.

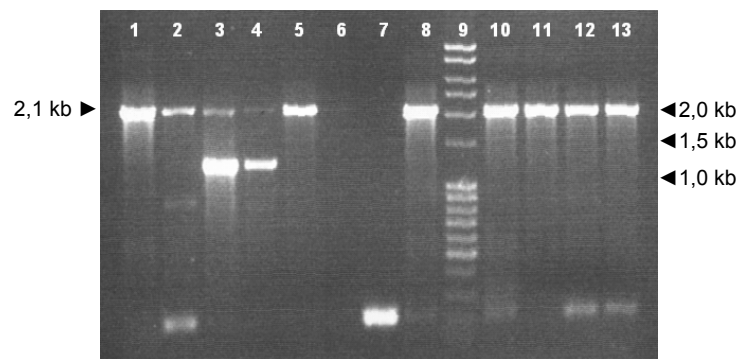


Abbildung 4.18: Nachweis der Insertion der cDNA der CyP450_1 ins Genom von *P. pastoris*. Kolonie-PCR mit den Primern 5`AOX for und 3`AOX rev, 12 Klone, 9: Marker

In positiven Klonen ließ sich die Insertion der CyP450_1-cDNA mit nichtkodierenden, flankierenden Bereichen mit einer Länge von insgesamt 2,1 kb durch Kolonie-PCR nachweisen (Abb. 4.18).

Diese Klone wurden für die Analysen auf Proteinebene verwendet. Die Vorkulturen wurden in BMGY-Medium, welches Glycerin als C-Quelle besaß, durchgeführt. Im Hauptkulturmedium BMMY diente Methanol als C-Quelle und gleichzeitig als Induktor des AOX1-Promotors. Nach Induktion, Zellaufschluss und Solubilisierung mit Obas (4-Octylbenzol-Amidosulfobetain; Henningsen *et al.*, 2002) und Cholsäure, wurde in einem Screening der Klon Xcm1,45 von mehreren hundert Transformanten auf Proteinebene mittels *Western Blot* identifiziert, der das Zielgen exprimiert (Abb. 4.19).

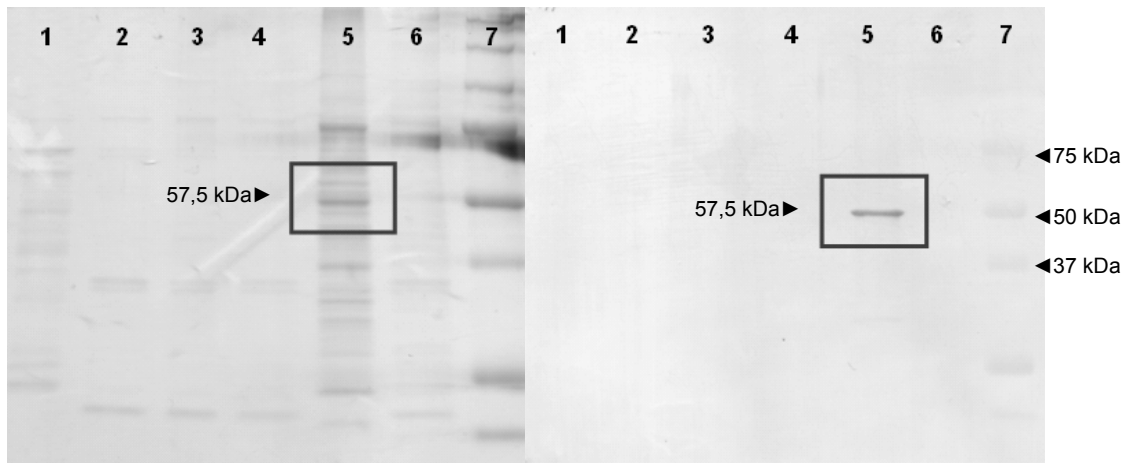


Abbildung 4.19: SDS-PAGE (links) und *Western Blot* (rechts) der rekombinanten CyP450_1. Coomassiefärbung, 1-6: verschiedene Klone, 7: Marker, 5: Klon Xcm1,45

Dabei bindet der antigenspezifische Primärantikörper an das ausgewählte Epitop der CyP450_1 Monooxygenase. An den primären Antikörper bindet wiederum ein Sekundärantikörper, Anti IgG Kaninchen aus Ziege, an welchen eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird das Substrat BCIP (Bromchlorindolylphosphat) dephosphoryliert. Die Visualisierung erfolgte mit NBT (Nitrobluetetrazoliumchlorid), welches zusammen mit dem dephosphoryliertem BCIP ein blauvioletttes Präzipitat ergab (s. Kapitel 3.2.3.4).

4.1.10 Biotransformationsversuche

Nach dem Nachweis des rekombinanten Enzyms in *P. pastoris* mittels *Western Blot* wurde der exprimierende Klon Xcm 1,45 in Schüttelkolben submers kultiviert. Das Zellysate wurde anschließend in Biotransformationsversuchen zur Oxidation von α -Pinen zu Verbenol eingesetzt, wobei Parameter wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur, Inkubationsdauer und Cofaktorzugabe variiert wurden. Dabei wurde keine Oxidation des Monoterpens α -Pinen detektiert.

Neben α -Pinen wurden weitere potentielle CyP450-Substrate zur Transformation eingesetzt. Dabei wurden Substrate gewählt, deren Oxidation durch andere CyP450 Monooxygenasen bereits bekannt ist. Die Literaturstellen sind ebenfalls in der Tabelle 4.8 angegeben.

Tabelle 4.8: Im CyP450-Aktivitätsassay verwendete Substrate

Substrat	Referenz
3-Hydroxybenzoat	Matsuzaki und Wariishi, 2005
Campher	Matsuzaki und Wariishi, 2004
Cineol	Matsuzaki und Wariishi, 2004
Cumarin	Matsuzaki und Wariishi, 2004
Cumarinsäure	Matsuzaki und Wariishi, 2004
Ergosterol	Akiyama <i>et al.</i> , 2004
7-Ethoxycumarin	Akiyama <i>et al.</i> , 2004
Laurinsäure	Lentz, 2001
Myristinsäure	Lee <i>et al.</i> , 2003
Zimtsäure	Fahrendorf und Dixon, 1993

In einem CyP450-Aktivitätsassay (modifiziert nach Akiyama *et al.*, 2004), welcher den NADPH-Verbrauch fotometrisch bei 340 nm erfasst und einen Elektronentransport vom Cofaktor NADPH über eine endogene Reduktase aus *P. pastoris* zur rekombinanten Monooxygenase voraussetzt, wurde ebenfalls keine Enzymaktivität festgestellt.

4.1.11 Isolierung der cDNA einer P450 Reduktase (EC 1.6.2.4)

Da bisher keine Aktivität der rekombinanten CyP450 Monooxygenase in *P. pastoris* gefunden wurde und eukaryontische CyP450-Systeme aus zwei Komponenten bestehen, wurde die Isolierung einer P450 Reduktase versucht. Wie bei den CyP450 Monooxygenasen standen keine Peptiddaten zur Ableitung degenerierter *Primer* zur Verfügung. Über Aminosäuresequenzvergleiche wurden diverse Konsensussequenzen erkannt und zur Ableitung degenerierter *Primer* verwendet.

4.1.11.1 Primerableitung und PCR

Zur Isolierung einer P450 Reduktase-cDNA wurde ein Alignment von Sequenzen aus dem Ascomyceten *Aspergillus niger*, der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* und den Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium* und *Coriolus versicolor* erstellt. Hierbei wurden zehn konservierte Regionen, die Bindestellen für den Cofaktor NADPH (3), für die prosthetischen Gruppen FAD (2) und FMN (3), sowie für die CyP450 Monooxygenase (2), identifiziert (Abb. 4.20).

	FMN 1	
<i>Aspergillus</i>	ETGKNCVIFFGSQTGTAEDYASRLAKEGSQRFLKTMVADLEEYDYENLDQFPEDKVAFF	120
<i>Schizosaccharomyces</i>	AEKLTAAVFFGSQTGTAEDFAYRFSTEAKANFNLTNMVFDLENYDLTDLDNFDRSKLLVF	107
<i>Phanerochaete</i>	EGKKRIVIFFGSQTGTAEEYATRLAKEAKSKFGLASLVCDPEEYDFENLDQVPEDCCVFF	120
<i>Coriolus</i>	EGKKRIVIFFGSQTGTAEEYATRLAKEAKQKFGLASLVCDPEEYDFENLDQVPEDSCVFF	119
	***** : : * . . . * . * . : * * * : * * : * * . . . *	
	FMN 2	FMN 3
<i>Aspergillus</i>	VLATYGEGETDNAVIFYQFFTGDVAFESAS-ADEKPLSKLKYVAFGLGNNTYEHYNAM	179
<i>Schizosaccharomyces</i>	FLATYGEGETDNAVAFLLQLLEGDDTVFSSGKIEDTPFEGIRYAFIFGLGNHTYEEYNAM	167
<i>Phanerochaete</i>	VMATYGEGETDNAVQNLSDSEFEFSNGE-----HKLPGLKYVIFGLGNKTYEHYNLI	176
<i>Coriolus</i>	VMATYGEGETDNAVTLQNLSDSFEFSNGE---HKLPGLKYVIFGLGNKTYEHYNLI	175
	. ***** : * : . . . * . . . : : * * ***** : * * : * * . . . *	
<i>Aspergillus</i>	VRQVDAAFQKLGFPQRIGSAGEGDDGAGTMEEDFLAWKEPMWAALSSEMDLEEREAVYEPV	239
<i>Schizosaccharomyces</i>	AKKVDAAMTRLGATRVGNLGLGDDAAGMLEEDYLQWKDDTLPEIGKLFHLQEVHKEYNPM	227
<i>Phanerochaete</i>	SRNVDRDLQKMGAIRIGERGEDDDK-SMEEDYLEWKDGMWEAFAKAMNVEEGQGSDSPD	235
<i>Coriolus</i>	GRNVDSLAKMGGIRIGERGEDDDK-SMEEDYLEWKDGMWEEFGRVMGVVEEGQGSDSPD	234
	: * * : : * * * : * * * : * * * : * * : * * : * * . . . *	
<i>Aspergillus</i>	FCVTENESLSPEDETVYLGEPTQSHLQG--TPKGPYSAHNPFIAPIAESRELFVTKD-RN	296
<i>Schizosaccharomyces</i>	FEVIEKPEISNTSSTVFLGEPQRQLKGNVASKAPRSQANPFSSPVRSLELFSKSGS-RN	286
<i>Phanerochaete</i>	FVVTEVFDHP--EEKVYLGELSARALTR---TKGIHDAKNPYPAPIIAAKELFAPGSDRN	290
<i>Coriolus</i>	FAVTEVSDHP--QEKVYLGELSARALTR---SKGIHDAKNPYPAPITVARELFAEGSDRN	289
	* * * . . . * : * * * : * * . . . * * : * * : * * . . . *	

Abbildung 4.20: Ausschnitt eines Alignments der Aminosäuresequenzen von P450-Reduktasen. *Aspergillus*: *A. niger*, Q00141; *Schizosaccharomyces*: *S. pombe*, P36587; *Phanerochaete*: *P. chrysosporium*, Q9HDG2; *Coriolus*: *C. versicolor*, Q8X1W0; die konservierten Regionen der FMN-Bindestellen 1, 2 und 3 sind hervorgehoben, ClustalW

Von den konservierten Regionen der FMN-Bindestellen 1, 2 und 3 wurden verschiedene degenerierte *Forward*- und *Reverse-Primer* abgeleitet und diese im PCR-Screening in verschiedenen Kombinationen eingesetzt (Tab. 4.9).

Tabelle 4.9: Verwendete *Primer* zur Isolierung der cDNA einer P450 Reduktase

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
5022	redneu1afor58	5'>A(AG)A CCG G(CT)A CCG C(ACT)G AGG<3'	65,2°C
5023	redneu1arev58	5'>CCT C(AGT)G CGG T(AG)C CGG T(CT)T<3'	65,2°C
5030	redneu3for58	5'>AAC AAG AC(ACT) TAC GAA CA(CT) TAC A<3'	56,8°C
5031	redneu3rev58	5'>TGT A(AG)T GTT CGT A(AGT)G TCT TGT T<3'	56,8°C
5032	redneu5afor58	5'>CTC C(ACT)T TCA G(CT)G G(CT)T TCG<3'	60,7°C
5033	redneu5arev58	5'>CGA A(AG)C C(AG)C TGA A(AGT)G GAG<3'	60,7°C
2447	CPR_1for mod	5'>GGA TTC ATG AAC CAC CAT CAT CT<3'	55,3°C
2446	CPR_1rev60	5'>CCC GAA ATA CGG GAT ATC AGA<3'	57,9°C
1798	pYEScoXba I for	5'>TCT AGA AGG GAA GAA AGC GAA AGG<3'	61,0°C
1799	Xba I pYES rev	5'>GGG ACC TAG ACT TCA GGT TGT C<3'	62,1°C

In mehreren Versuchen wurden diese *Primer* auch in Kombination mit universellen SMART III und CDS III-Primern verwendet. Ein Ausschnitt des PCR-Screenings ist in der folgenden Abbildung 4.21 dargestellt.

Spur	Primerkombination
1	5022+ 5027
2	5022+ 5029
3	5024+ 5027
4	5024+ 5029
5	5022+ 5031
6	5024+ 5031
7	5022+ 5033
8	5024+ 5033
9	5026+ 5031
10	5028+ 5031
11	5026+ 5033
12	5028+ 5031
13	5030+ 5033
14	5022+ 5035
15	5024+ 5035
16	5026+ 5035
17	5028+ 5035
18	5030+ 5035
19	5032+ 5035

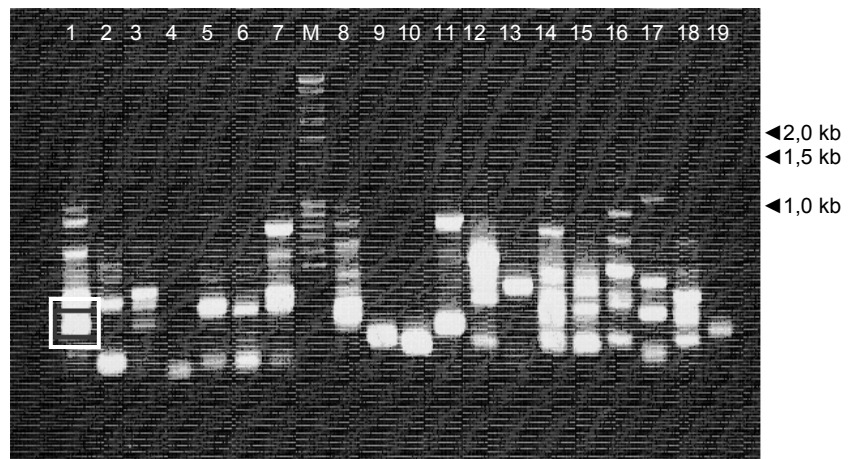


Abbildung 4.21: PCR-Screening zur Isolierung der cDNA einer P450 Reduktase.
Auftrennung der PCR-Produkte aus unterschiedlichen Primerkombinationen durch
Agarosegelelektrophorese, M: Marker

Mehrere Banden im erwarteten Größenbereich wurden aus dem Agarosegel isoliert, in den Vektor pCR2.1 zwischenkloniert und dieser in *E. coli* vermehrt. Die entsprechenden Plasmide wurden isoliert und sequenziert. Die hervorgehobene Bande wurde anhand von Datenbankvergleichen als Fragment einer P450 Reduktase identifiziert, die Gesamtsequenz mit einem offenen Leseraster von 2232 bp (744 Aminosäuren) durch *Primer Walking* ermittelt und anschließend mit den Primern 2446 und 2447 amplifiziert (Abb. 4.22).

```

GGATTCATGAACCACCATCTCCATTCCAAATCCCTCACCTCCTCCTCCTCCCATCGCCTGATTCCCTATCTCTCCCTGT
GCGAGGCGTCGTCGCGAGTGACCTGGCTACGGTCCCACCACCTCATAATTAATTCATAAACCGCATTCCTAGCAGCATGGCG
AGCTCGTCGTCGTCGGACGTCCTCGTTCTTGCTGTCGGCGTCGCGACTCGCCGCGATATATCTTTCCGGGACCAGCTCTTCGC
CCAAGCTAAACCAAAGTCGGTTCCTGTGCCAATTCGAAAGCGTCAAATGGTCCGGAAACCCTCGCGACTTCATCGCAAAGA
TGAAGGAAGGGAAAAGCGCCTGGTGATATCTACGGTCTCAAACGGGTACGGCTGAAGAGTATGCCATCCGCTCCTCGCAAAG
GAAGCAAAGTCCAAGTTCGGCCTCGCGTCGCTGGTCTGTACCCCGAGGAATATGATTTTGAACCTTGACCAGCTGCCGGA
GGATTGCGCTGTTTCTTCTCGTCATGGCTACCTACGGCGAGGGCGAGCCACGGACAACCGGGTGACACTCATGCAGAACCTCG
AAGACGAGTCCTTGAATTCAGCAACGGTGAACACAACTCGAGGGCCTCAAGTACGTTGCGTTCAGCTTGGGCAATAAGACG
TATGAGCAATTACAACAAGATCGGTCGTGATGTGGATAAATGACTGACGAAGATGGGTGCGATACGGATTGGCGAGCGTGGAGA
AGGCGACGACGACAAGAGCATGGAGGAGGACTATCTTGAGTGAAGGACGGCATGTGGGATGCGTTCCTCGGCTGTATGGGCG
TTGAAGAAGGTCAAGGTGGTGATACCCAGACTTTGCCGTCACCGAGCTCGAATCCCATCCCCGAGAAAGTCTACCTCGGT
GAACTCTCCGCCCGCCCTCACCAAACAAGGGTATCCACGACGCCAAGAACCCTTCCCAGCACCCATCTCTATTGCCCG
GGAGCTCTTCCAATCGACGCACGACCGCAACTGTGCCATCGAGCTCAACACCGAATCCTCTGGCATCTCCTACCAGCACG
GCGATCACGTCGGCGTCTGGCCGTTCAACCCCGATGTTGAAGTCAACCGTCTCCTCTGTGCCCTCGGCTCTACGACAAGAAG
GACAACGTTATTGGTATTGAATCACTCGACCCCGGCTCGCGAAAGTACCGTTCCTGTGCCAACGACGATGCAGACGGTCT
CGGCCACTACATCGACATCAGTGGCGTGGTGGACGACAGATCCTCGGCGCCCTATCTAAGTTCGCACCTAACCCCGAGGCTG
AGCGTCTTGAAGGGCCTTAGCGCTAACAAAGGAAGATACCGCACCTTATCGCCAACGGATCGCTGAAACTCGGTGAAGTC
CTCCAACCTCGACCGGCAACGACCTCTCCGCCGTGCCTTCCCCGGAGAACAACACTACAGCATGGACAATCCCTTCGACCCAT
CGTCTCCTCGATCCCGCGTCTCCAGCCTCGGTACTACTTATCTCCTCCAGCCCCAAGCTGCACCCATACTCCATCCACGTGA
CCGCCGTCGTTCTCAAATACGAGTCCATTTCCAACGAGCGCGTAAATGGCCGCTGGATCTTTGGTGTGCGCTCAAACCTCCTG
CTCAACCTCAAATACGCTCGCAACGGAGAGACCGCCCCCTGGTGCACCGCGCGGAGTCAAAGGCAGTACACCCGCAATC
TCCAGGTTATGCCATTGAAGTCCCGAGGCGCATACAAGCAGGAGACCATCTACAAGGCCCCCATCCACGTCAGACGTTCCA
CCTTCCGCTGCCACCAACCCCAAGAGCCCCGTCATCATGATTGGCCCTGGAACCGCGCTCGCACCGTTCGCGGGATTCTATC
CAAGAGCGCGTCGCCCTCGCCCGGCGCTCGATCGAAAAGAACGGCCGGACGCCCTCGCCGACTGGGGCCGCATATCCCTGTT
CTACGGCTGCCGCAAGTCCACGGAAGACTTCCTCTACAAGGACGAGTGGCCCAAGTATCAGGAGGAGCTCCCGCGCAAGTCA
CGATGCACTGCGCGTCTCCCGGAGGTGTACAGGCTGATGGGAGCAAGATCTACGTCACGACCTGCTGTGGGACGACCCG
GAGCAGGTTGCCGACGCTATCATCAACGCAAGGGGTACATCTACATCTGTGGTACGCGAAGAGCATGAGCAAGCCGTTGA
GGAGACACTTGCGCGGATTTTGGGAGAGGCCAAGGGTGGATCTGCAGACGTTGAGGGCAATGCGGAGGTCAAGTTGCTGAAGG
AGCGCTCGAGACTCATGCTCGACGTTTGGAGTTGAAGGAACGACACTTGTCTGACTTGACCGCAGTATAGATTTATCTATAT
GCCTTGCTCATCCATACTTACTTACCTACATCTGATATCCCGTATTT

```

MASSSSDVLVLAVGVALAAIYLFRDQLFAQAKPKSVVPVPTSKASNGSGNPRDFIAKMKEGKRLVIFYGSQTGTAEEYAIRL
AKEAKSKFGLASLVCDPEEYDFENLDQLPEDCAVFFVMATYGEGETDNAVTLMQNLEDESFEFNGEHKLEGLKYVAFSLGN
KTYEHYNKIGRDVDNVLTKMGAIRIGERGEDDDKSMEEDYLEWKDGMWDAFSAAMGVVEEGGGDTPDFAVTELESHPPEKVV
LGELSARALTKTKGIHDAKNPFPAPISIARELFQSTHNRNCVHIELNTESSGISYQHGDHVGWVPSNPDVEVTRLLCALGLYD
KKDNVIGIESLDPALAKVFPVPTTYATVLRHYIDI SAVAGRQILGALSFKFAPNPEAEFLKGLSANKEEYRTLIANGCLKLG
EVLQLAAGNDLSAVPSPENTTAWTIPFDTISSIPRLQPRYSISSPKLHPNSIHVTAVVLKYESIPNERVNGRWIFGVGSN
FLNLKYAANGETAPLVATGAESKAASTAIPGYAIEGPRGAYKQETIYKAPIHVRRSTFRLPTNPKSPVIMIGPGTGVAPFRG
FIQERVALARRSIEKNGPDALADWGRISLFGCRKSTEDFLYKDEWPQYQELRGKFTMHCAFSREVYRDPGSKIYVQDLLWD
DREQVADAI INKGYIYICGDAKSMKAVEETLARILGEAKGGSADVEGNAEVKLLKERSRLMLDQVWS*

Abbildung 4.22: DNA- und übersetzte Aminosäuresequenz der P450 Reduktase (CPR_1) aus *P. sapidus*. 10 konservierte Regionen in nachstehender Reihenfolge sind unterstrichen: FMN-1, P450-1, FMN-2, FMN-3, P450-2, FAD-1, FAD-2, NADPH-1, NADPH-2, NADPH-3

Die klonierte P450-Reduktase-Sequenz wies eine maximale Homologie von 75% zu einer P450 Oxidoreduktase aus dem Basidiomyceten *Coriolus versicolor* auf. Bei weiteren homologen Sequenzen handelte es sich ebenfalls um P450 Reduktasen aus dem Basidiomyceten *P. chrysosporium* bzw. aus der Hefe *Rhodotorula minuta* (Tab. 4.10). Die charakteristischen konservierten Regionen der P450-, FMN- und FAD-Bindestellen wurden in der Gesamtsequenz identifiziert (Ichinose *et al.*, 2002).

Tabelle 4.10: Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der CPR_1 aus *P. sapidus*

	Accession number	Quelle	Länge [bp]	Homologie [%]	E-Wert	Literatur
1	AB065368	<i>C. versicolor</i> , P450 Oxidoreduktase	2504	75,46	0	-
2	AF193061	<i>P. chrysosporium</i> , NADPH-P450 Oxidoreduktase	2441	72,15	0	Yadav und Loper, 2000
3	AF193062	<i>P. chrysosporium</i> , NADPH- P450 Oxidoreduktase	2201	72,54	0	Yadav und Loper, 2000
4	AB055119	<i>Rhodotorula minuta</i> , mRNA P450 Reduktase	2365	65,66	3,7 ⁻³¹	-

4.1.11.2 Induktionsuntersuchungen mittels Realtime-PCR

Die relative Transkriptionsquantifizierung wurde analog zu den CyP450 Monooxygenasen durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.6). Aufgetragen ist die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl mit einem Schwellenwert, der dem Fluoreszenzwert 1 entspricht (Abb. 4.23)

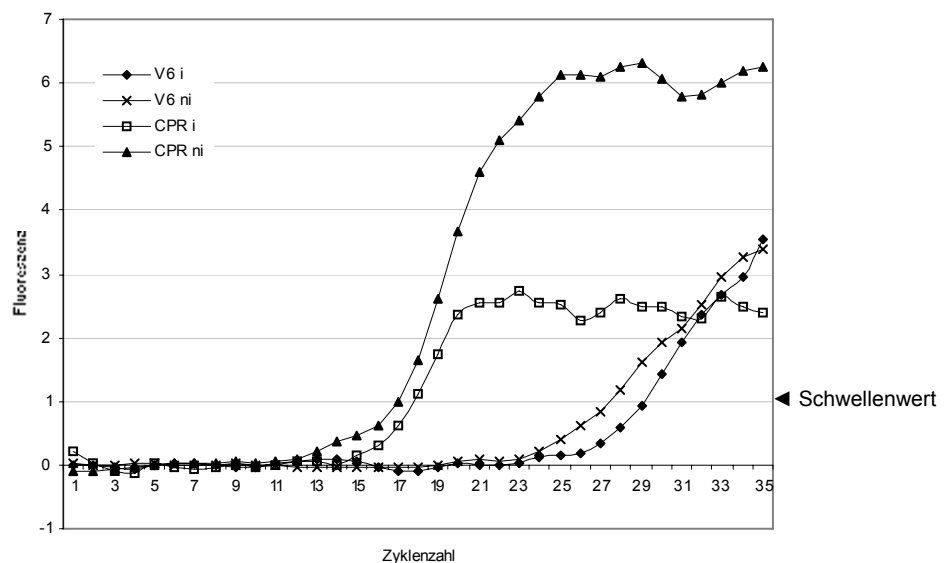


Abbildung 4.23: Amplifikationskurven der PCR-Produkte der CPR_1 und V6. i: cDNA aus induzierter Kultur als Template, ni: nicht induziert, Primer 4813 und 4814 (V6), 7020 und 7021 (CPR_1)

Die ermittelten C_t -Werte sowie ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ und das Expressionsverhältnis (Ratio) sind in folgender Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Tabelle 4.11: C_t -Werte, ΔC_t und $\Delta\Delta C$ der Amplifikationen CPR_1 und V6

	CPR i	CPR ni	V6 i	V6 ni
C_t -Wert	17,22	16,29	28,42	26,47
ΔC_t	-11,2	-10,18	-	-
$\Delta\Delta C_t$	-1,02	-	-	-
Ratio	2,03	-	-	-

Im Vergleich zur nicht induzierten cDNA-Bank wurde die P450 Reduktase CPR_1 im induzierten Ansatz etwa um den Faktor 2 stärker exprimiert.

Die Transkriptionsrate der P450 Reduktase CPR_1 war ähnlich hoch wie die der CyP450_1 (C_t : 19,35) und deutlich höher als bei der CyP450_3 (C_t : 29,53).

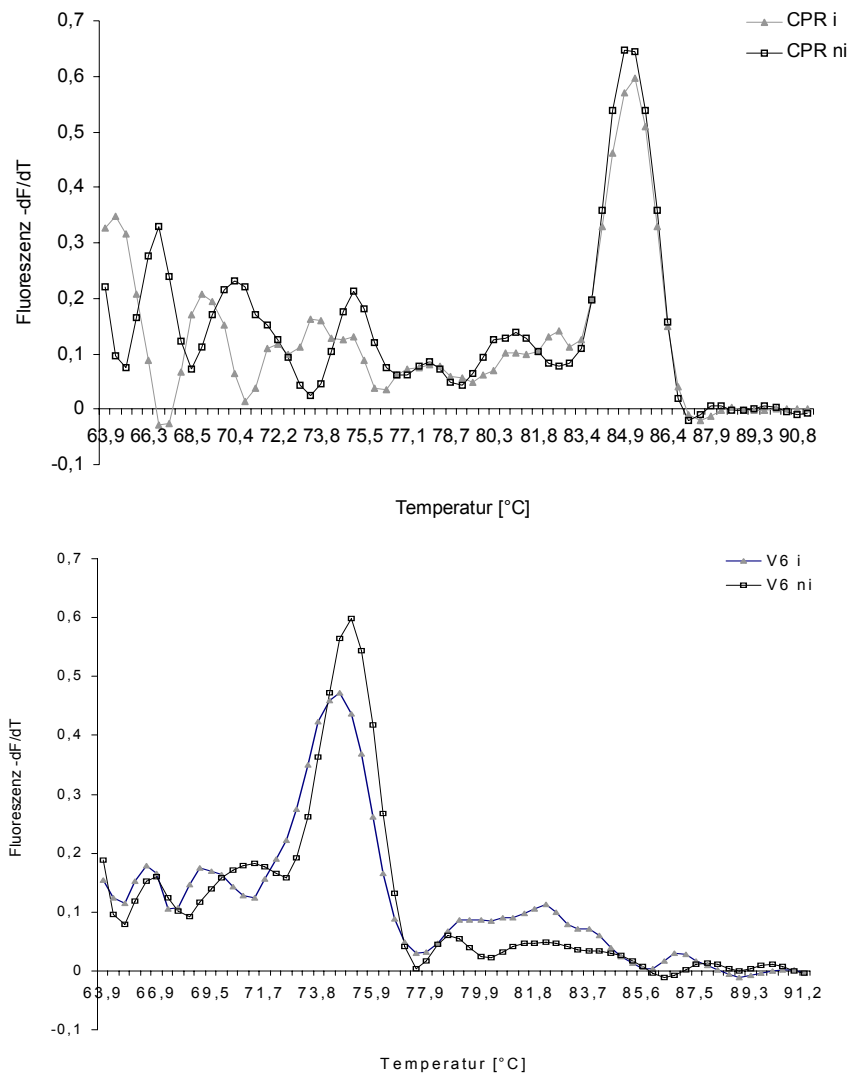


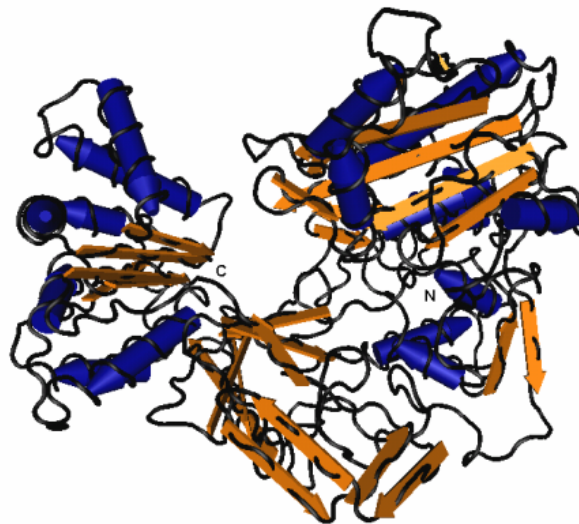
Abbildung 4.24: Schmelzkurven der PCR-Produkte CPR_1 und V6. CPR_1: cDNA der P450 Reduktase, V6: interner Standard, i: cDNA aus induzierter Kultur, ni: cDNA aus nicht induzierter Kultur

Die Schmelzkurvenanalyse zeigte in beiden Ansätzen die Bildung von Primer-Dimeren, welche das Fluoreszenzsignal beeinflussen (Abb. 4.24). Die übereinstimmenden Hauptpeaks entsprachen den Schmelztemperaturen der spezifischen PCR-Produkte, auf die sich die C_T -Werte beziehen.

4.1.11.3 Hypothetisches 3D-Modell der P450 Reduktase

Mit 744 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von etwa 80,5 kDa handelt es sich um ein komplexes Protein (Abb. 4.25).

a)



b)

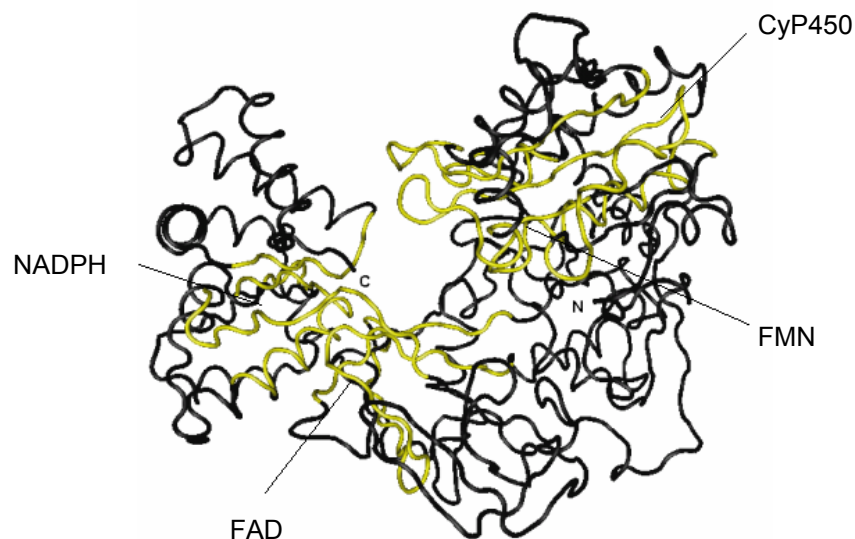


Abbildung 4.25: 3D-Modelle der P450 Reduktase CPR_1. Modell a zeigt die Tertiärstruktur des Proteins, Modell b weist auf die konservierten Bindedomänen für CyP450, FMN, FAD und NADPH hin, SWISS-MODEL

Das Modell a zeigt die Sekundärstrukturen des Proteins, Modell b die konservierten Binderegionen der Cofaktoren und prosthetischen Gruppen. Die hervorgehobenen Bindedomänen verdeutlichen die funktionelle Struktur des Enzyms. Die Reduktionsäquivalente werden vom Cofaktor NADPH über die prosthetischen Gruppen FAD und FMN auf die CyP450 Monooxygenase übertragen.

4.1.12 Das Expressionssystem *S. cerevisiae*

Die Sequenzen CyP450_1, CyP450_3 und CPR_1 wurden zur Expression in *S. cerevisiae* in den Expressionsvektor pYES2.1TOPO (Invitrogen) kloniert (s. Kapitel 3.1.6). Es handelte sich hierbei um einen TA-Klonierungsvektor, bei dem die Inserts direkt nach der Amplifikation mittels Taq-Polymerase in den Vektor ligiert wurden, da die Taq-Polymerase A-Überhänge produziert (s. Kapitel 3.2.2.10). Der Vektor besaß hinter der TA-Klonierungsstelle eine optionale His₆-Domäne, die sowohl für die Synthese spezifischer Antikörper, als auch für die Reinigung der rekombinanten Enzyme herangezogen werden konnte. Für die Konstruktion der Vektoren wurde das natürliche Stopcodon eliminiert, so dass „*in frame*“ ein Fusionsprotein aus CyP450_1, CyP450_3 bzw. CPR_1 mit einem His-Tag entstand. Für die Expression in *S. saccharomyces* wurden alle möglichen sechs Konstrukte, drei Gene jeweils mit und ohne His-Tag, hergestellt (Abb. 4.26 und 4.27).

4.1.12.1 Klonierung und Biotransformationsversuche

Nach der Kontrolle der Richtung des Inserts durch Sequenzierung wurden die Plasmide mit durchgehender codierender Sequenz in *E. coli* vermehrt und anschließend für die Transformation durch Elektroporation in *S. cerevisiae* eingesetzt.

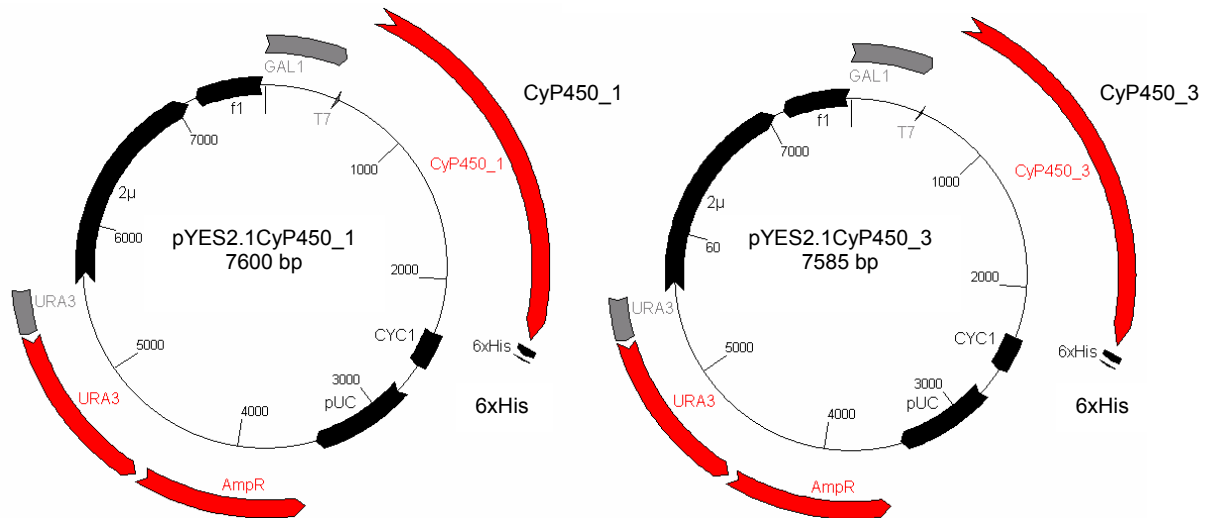


Abbildung 4.26: DNA-Konstrukte pYES2.1CyP450_1 und pYES2.1CyP450_3. Konstrukte für die heterologe Expression beider Monooxygenasen in *S. cerevisiae* (s. Kapitel 3.1.6)

Die Selektion erfolgte in *E. coli* anhand der Ampicillinresistenz, in *S. cerevisiae* anhand der Uracil-Auxotrophie der Expressionsstämme auf uracilfreien Selektionsnährböden.

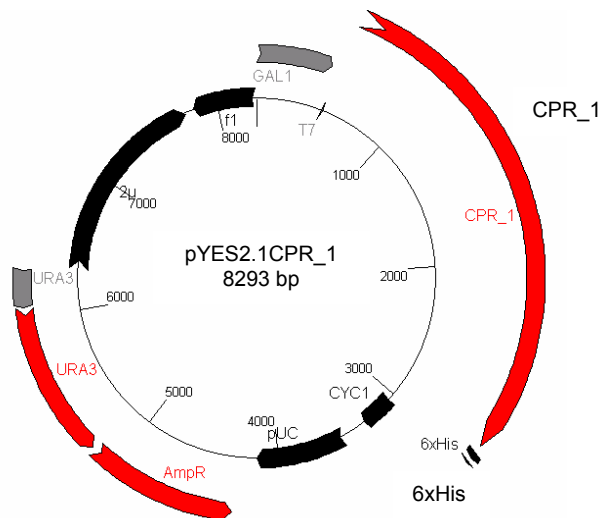


Abbildung 4.27: DNA-Konstrukt pYES2.1CPR_1. Konstrukt für die heterologe Expression der P450 Reduktase CPR_1 in *S. cerevisiae*

Zellfreie Extrakte von Reduktase-exprimierenden Klonen wurden in Kombination mit CyP450-exprimierenden Klonen in Biotransformationsansätzen eingesetzt. Eine Aktivität sowohl bezüglich der Oxidation von α -Pinen zu Verbenol, als auch bezüglich weiterer CyP450-Substrate (Tab. 4.8) wurde nicht detektiert.

4.1.12.2 Coexpression in *S. cerevisiae*

In einer alternativen Strategie wurden Coexpressionsversuche der Monooxygenasen mit einer korrespondierenden P450 Reduktase aus *P. sapidus* in *S. cerevisiae* durchgeführt. Hinter der optionalen His-Tag-Sequenz besaß der Vektor eine Xba I-Schnittstelle, die für die Klonierung der Reduktasesequenz CPR_1 genutzt wurde.

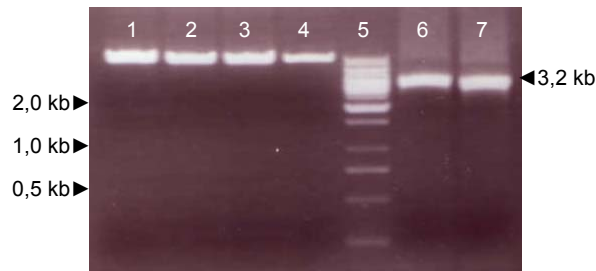


Abbildung 4.28: Linearisierung der Expressionsvektoren. pYES2.1CyP450_1 (1), pYES2.1CyP450_1His-tag (2) pYES2.1CyP450_3 (3) und pYES2.1CyP450_3His-tag (4), Marker (5), 6 und 7: PCR-Produkt Gal1-CPR_1 (Primer 1798 und 1799) mit Xba I-Schnittstellen

Nach der Linearisierung der bestehenden Vektoren pYES2.1CyP450_1 und pYES2.1CyP450_3 wurden an die cDNA-Sequenz der P450 Reduktase CPR_1 mit GAL1-Promotor mit einer Gesamtlänge von etwa 3,2 kb durch PCR-Mutagenese Xba I-Schnittstellen angehängt (Abb. 4.28).

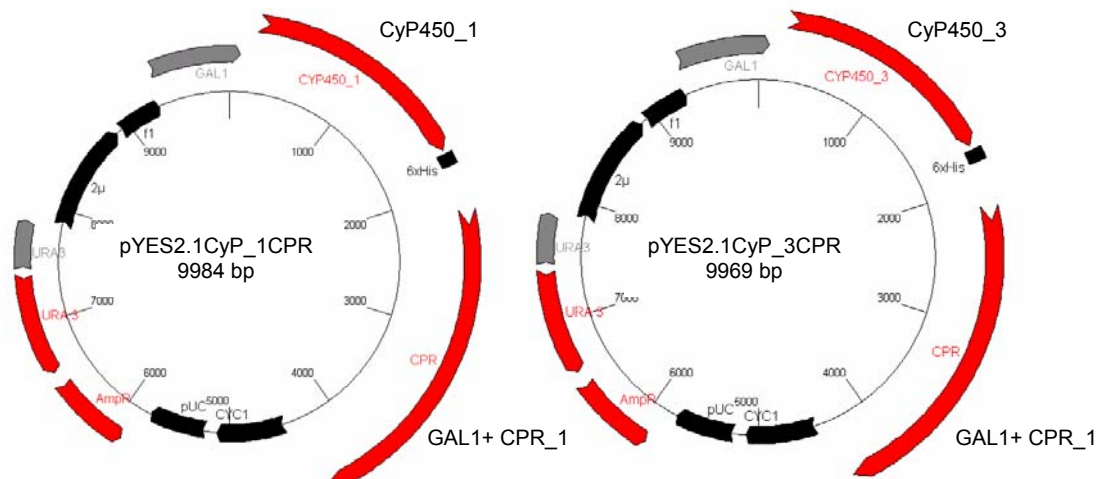


Abbildung 4.29: DNA-Konstrukte zur funktionellen Coexpression. CyP450_1 und CyP450_3 mit CPR_1 in *S. cerevisiae*, pYES2.1CyP450_1CPR_1 und pYES2.1CyP450_3CPR_1

Als Template wurde der ebenfalls bestehende Vektor pYES2.1CPR_1 verwendet. Nach der Restriktion wurden diese über die Xba I-Schnittstelle zusätzlich in die Vektoren kloniert. Es entstanden die Konstrukte pYES2.1CyP450_1CPR_1 und pYES2.1CyP450_3CPR_1 (Abb. 4.29). Diese wurden in *E. coli* vermehrt und anschließend in *S. cerevisiae* transformiert. Die Klonierung der CPR_1-Sequenz wurde mittels Kolonie-PCR nachgewiesen (Abb. 4.30).

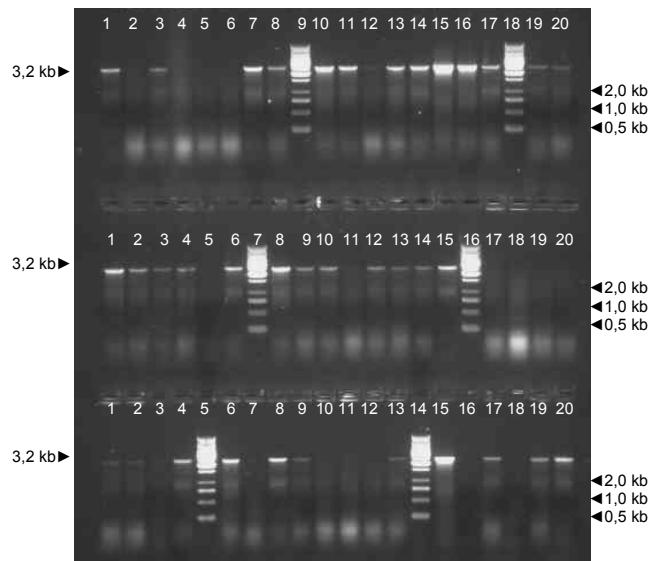


Abbildung 4.30: Nachweis der Klonierung der CPR_1 in den Vektor pCR2.1CyP_1 und pCR2.1CyP_3. Kolonie-PCR mit den Primern 2446 und 2447 (Tab. 3.3)

4.1.12.3 Biotransformationsversuche

Die plasmidtragenden Klone wurden kultiviert und mit Galactose induziert. Nach 24stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden in Biotransformationsexperimenten mit α -Pinen und im CyP450-Aktivitätsassay eingesetzt. Eine Aktivität sowohl hinsichtlich der Oxidation von α -Pinen, als auch bezüglich weiterer CyP450-Substrate (Tab. 4.8) wurde nicht festgestellt.

4.2 Die Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* (EC 3.1.1.x)

In vorangegangenen Arbeiten wurde das Potential zur enzymatischen Xanthophyllesterhydrolyse verschiedener Basidio- und Ascomyceten untersucht. Die Kulturüberstände des Basidiomyceten *P. sapidus* zeigten eine hocheffiziente Esterhydrolyse unter Bildung freier Xanthophylle (Zorn *et al.*, 2005a). Das hierfür verantwortliche Enzym wurde proteinbiochemisch gereinigt.

4.2.1 Proteinbiochemische Darstellung

Nach den chromatographischen Reinigungsschritten, Ionenaustausch- (IEC) und Größenausschlusschromatographie (GFC), wurde unter nativen Bedingungen ein Molekulargewicht von 430 kDa festgestellt. Mittels denaturierender SDS-PAGE wurde eine Bande mit einer Größe von 54,9 kDa detektiert, was auf ein Octamer schließen lässt (Abb. 4.31).

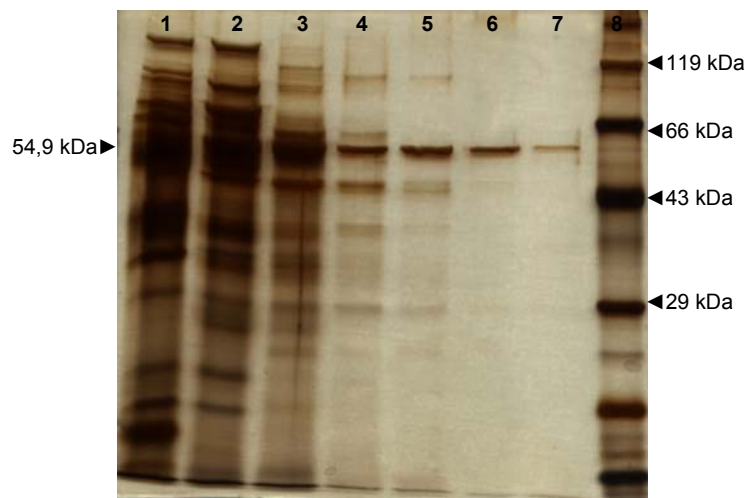


Abbildung 4.31: SDS-PAGE aktiver GFC-Fractionen. Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* mit einem Molekulargewicht von 54,9 kDa, 1-7: GFC-Fractionen; 8: Marker

4.2.2 Aktivitätsversuche der Xanthophyllesterhydrolyse

Um eine katalytische Aktivität des Monomers feststellen zu können, wurde eine modifizierte SDS-PAGE mit verringertem SDS-Gehalt im Laufpuffer (0,2 %) und ohne Zugabe von DTT und SDS im Probenpuffer durchgeführt. Auf eine Denaturierung durch Hitze wurde ebenfalls verzichtet.

Nach der Isolierung der Banden aus dem Gel wurden diese in Aktivitätsversuchen eingesetzt. Nach Inkubation (24 Stunden) mit Paprikaoleoresin wurden die Biotransformationsansätze extrahiert und anschließend mittels HPLC-DAD analysiert (s. Kapitel 3.2.4.1).

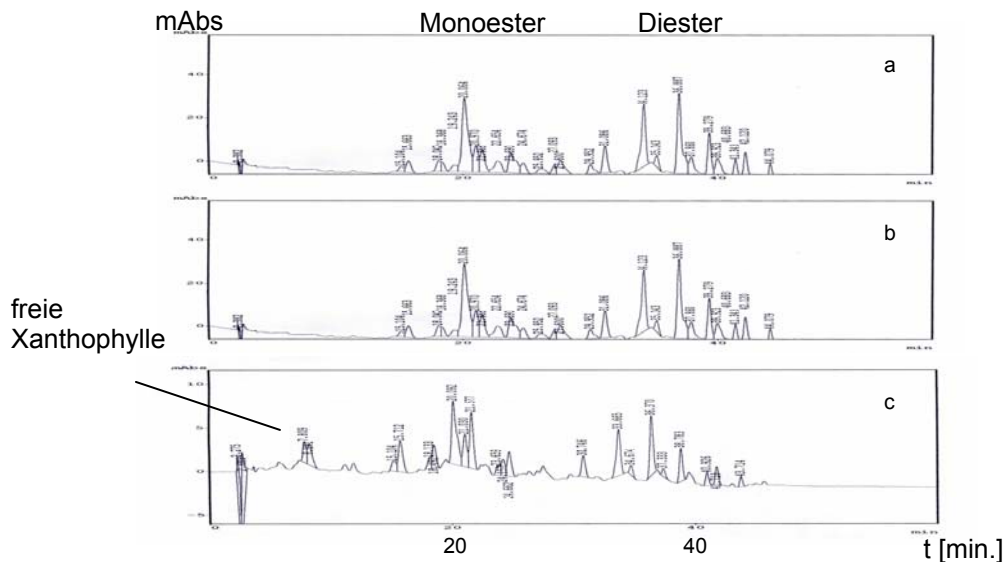


Abbildung 4.32: Biotransformation von Xanthophyllestern aus Paprikaoleoresin durch die Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*. HPLC-DAD-Chromatogramme: Xanthophyllesterase Monomer (a), hitzedenaturierte Negativkontrolle (b), Positivkontrolle (c)

Der Versuchsansatz a ist identisch mit der Negativkontrolle b. In der Positivkontrolle c (aktive Fraktionen aus der GFC) ist die Bildung von freien Xanthophyllen und eine Hydrolyse der Xanthophyllester festzustellen (Abb. 4.32).

4.2.3 Edman-Abbau und ESI-MS/MS

Das isolierte Enzym wurde tryptisch verdaut und die Aminosäuresequenzdaten durch ESI-MS/MS Sequenzierung der tryptischen Fragmente ermittelt (Tab. 4.12). Die durch Mikrosequenzierung des gereinigten Enzyms ermittelte Edman-Sequenz ist dort ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 4.12: Aminosäuresequenzen (Einbuchstabencode) tryptischer Peptide und Edman-Sequenz der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*

	Peptidsequenz	MH ⁺
1	G(I/L)NWPK	714,4
2	FF(I/L)QQR	838,5
3	QNTWAF(I/L)SK	1094,5
4	ADGVF(I/L)TDNPQR	1332,7
5	(I/L)AAFQGDVAFQAPR	1490,8
6	F(I/L)G(I/L)PYAQ.....R	1531,8
7 (Edman)	ANSVTLDSATFTGTSSGRVTKFLGPYAQPXTGDRRF	-

Die Edman-Sequenz besaß Homologien zu diversen Carboxylesterasen/Lipasen, die Sequenzen der tryptischen Peptide zu Lipasen aus *Candida rugosa* (*C. rugosa*). Ausgehend von diesen Daten wurden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, die in PCR-Screening-Versuchen zum Einsatz kamen.

Da es sich bei der Edman-Sequenz um den N-Terminus handelte, wurden hiervon verschiedene *Forward-Primer* und von den Peptidsequenzen diverse *Reverse-Primer* konstruiert (Tab. 4.13).

Tabelle 4.13: Primerkonstruktionen für die Isolierung der cDNA der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
3992	Lip2/E4 rev 3	5'> GCT TGG AA(ACG) AC(ACG) GC(AG) TCA CC <3'	64,0°C
0864	Lip2/E2 for	5'> GC(CT) ACC TTC ACC GGT ACC AC<3'	64,9 °C
2601	Lip2/E3 for	5'> GC(CT) AC(CT) TTC AC(CT) GGC ACC AC<3'	64,7 °C
2604	Lip2/E3 for 4	5'> GC(CT) AC(CT) TTC AC(CT) GGC ACT AC<3'	62,7 °C
8977	Lip2 gesamt for 2	5'> TGC CAT GTT CTT CGT TCT ACA <3'	60,0 °C

Bei der Verwendung von degenerierten Primern kam es bei der PCR zur Amplifikation von unspezifischen Artefakten. Um eine Aussage über die zu erwartenden Fragmentgrößen machen zu können, wurden die Peptidsequenzen 1-6 mit der Gesamtsequenz der Lipase 2 aus *C. rugosa* verglichen (Abb. 4.33).

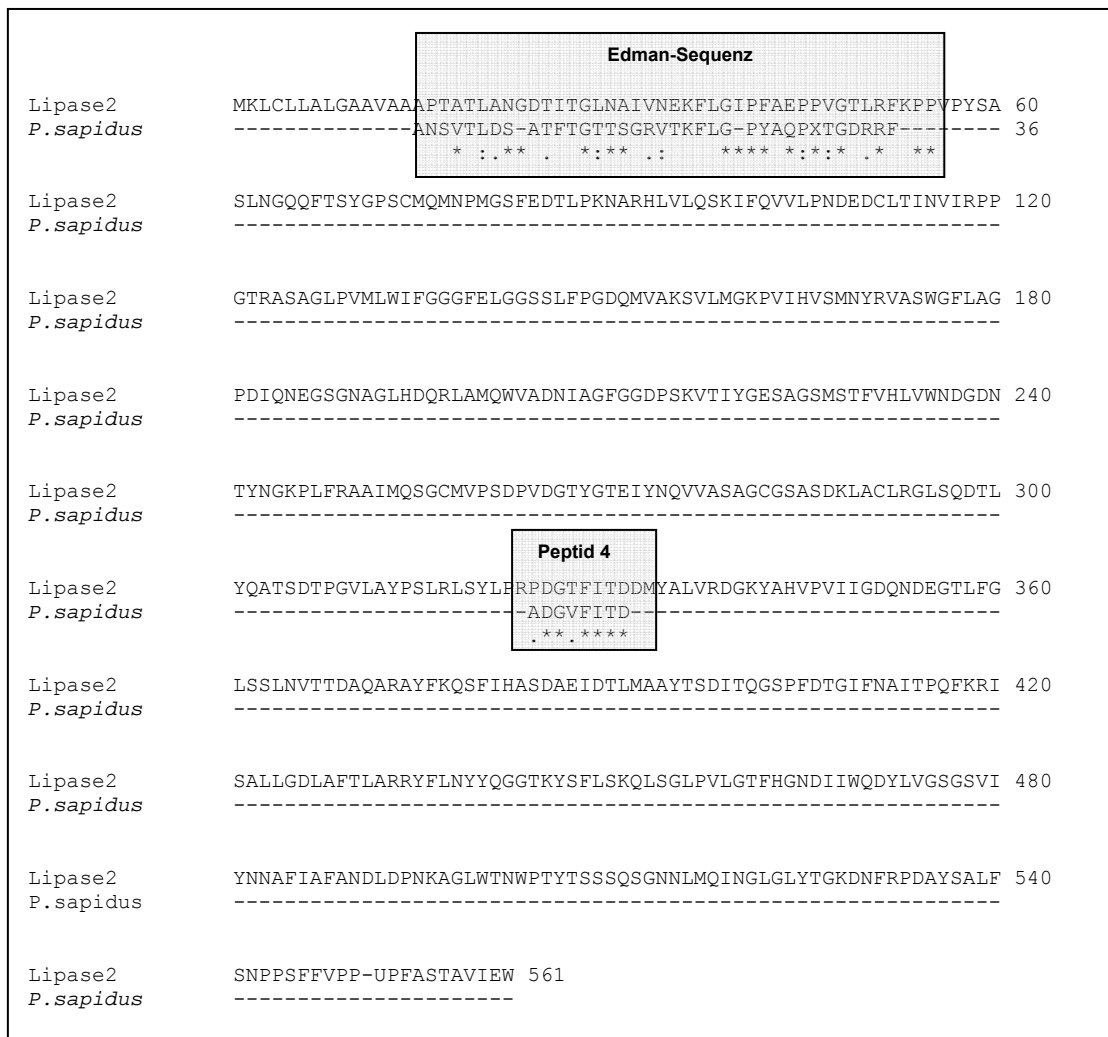


Abbildung 4.33: Sequenzalignment mit Lipase 2 aus *C. rugosa*. Vergleich der Edmansequenz und der Peptidsequenz 4 aus *P. sapidus* mit der Gesamtsequenz der Lipase 2 (P32946) aus *C. rugosa*, ClustalW

Von den tryptischen Peptiden wurde das Peptid 4 verwendet. Hierauf beruhend wurde die Größenvorhersage für das PCR-Screening getroffen. Aus dem Abstand von 300 bis 330 Aminosäuren der Kombination Edman-Peptid 4 ergab sich ein etwa 900-1100 bp großes PCR-Produkt.

4.2.4 PCR-Screening

Die von der Edman-Sequenz abgeleiteten degenerierten *Forward-Primer* wurden in Kombination mit den *Reverse-Primern* der Peptidsequenzen eingesetzt. Die Kombination Edman-Peptid 4 ergab mit drei Primer-Varianten eine Bande mit einer Größe von etwa 1100 bp (Abb. 4.34).

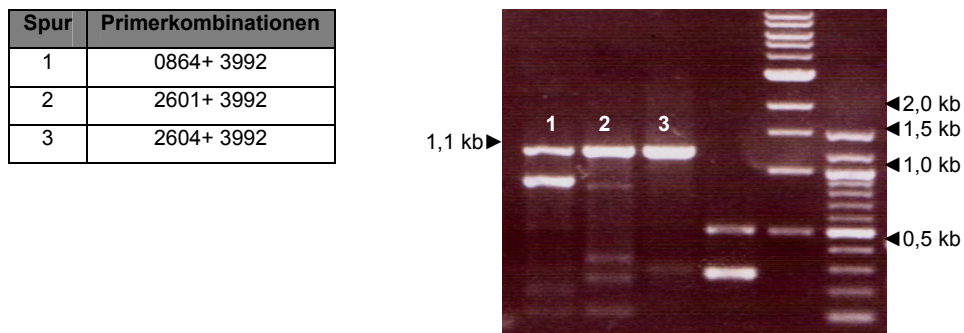


Abbildung 4.34: Ausschnitt aus der Screening-PCR. Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*

Durch die Verwendung eines Annealingtemperaturgradienten wurde die Spezifität der Primerbindung kontrolliert. Der Gradient reichte in acht Schritten von 5°C unterhalb bis zur Schmelztemperatur des Primers. Die drei Banden aus Abbildung 4.34 wurden jeweils erneut unter Verwendung eines Temperaturgradienten amplifiziert (Abb. 4.35).

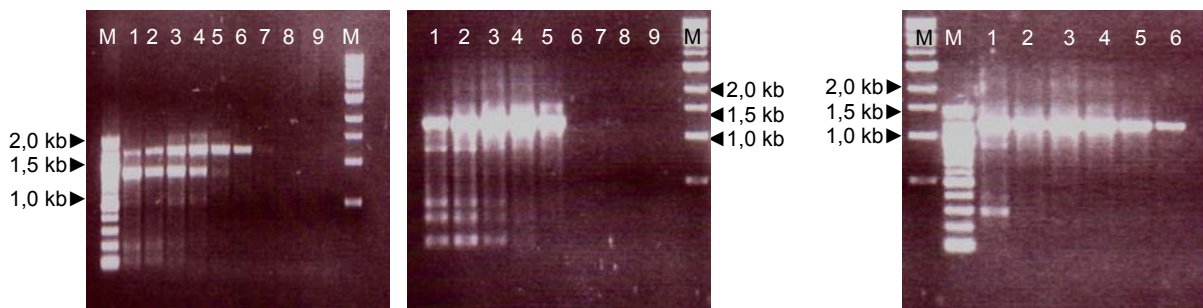


Abbildung 4.35: Gradient-PCR mit steigenden Annealingtemperaturen. (1: 58,6°C; 2: 59,3°C; 3: 60,2°C; 4: 61,3°C; 5: 62,4°C; 6: 63,5°C; 7: 64,5°C; 8: 65,4°C) Amplifikation der Fragmente mit den Primerkombinationen 1, 2 und 3

Mit zunehmender Annealingtemperatur nahm die Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte ab, es wurde ausschließlich das spezifische Fragment amplifiziert. Diese Banden wurden isoliert, in den Vektor pCR2.1-TOPO zwischenkloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen waren untereinander identisch und wurden zweifelsfrei als Fragment einer Lipase identifiziert.

```

ATGTTCCTTCGTTCTaCAGGCCGTGCTTGGGCTCTTCGCCaTCCAAACCGCCGCAACCCCTCTTCCCAGGGCAAACAGCGTAAACGCT
TGACTCTGCGACCTTACCAGGCACTACGCTCTGGTCGCGTACCAAGTTTCTGGGTATTCCCTACGCACAACCCCAACGGGGGACC
GCCGGTTCAGGCTGCCAGAGCCATTCCGCCGTACACGGgAACTGTACGGGCGACAGCATTTGGCCCTGCGTGCCCTCAGCAAAGT
GCTCGCCTCCCCCTGCCAGATGGCCTAGCTAGTGTATGTGGTTCGACTTGATCGTCAACACGGCATAATAAAGCTGTCTTCCCAGATAA
TGAAGACTGCCTCTCGATCAACGTTGTAGTACCCACAAGTGCAACGCCGACATCAAAGCTCCCTGTGGCAGTGTGGATCTTTGGTG
GTGGTTTCCAACGGGAGCCCTAGTCTGTATGATGGAGCTTGATAGTCGAGCGATCGATCCAGCTTGGCGAGCCAGTCACTAT
GTGAGCATGAACACAGATTAAGTGCCTTTGGCTTTTTGGCGAGCCAAGAAGTCAAAGACACTGGCGTTGGAAATCTTGGCTGCA
AGACCAGCGCAAGCATTACGATGGATCCAGAAGTACATCAGCAGCTTCGGAGGCGACCCACGAAAGTcaCTATTTGGGgAGAGA
GTGCGGGAGCTATTCTGTGGCACTCcaTaTGGTAGCGAACAATGGgAACCATGAGGGTCTCTTCCGTGGTGCCCTCATGCACTCT
GGATCCCCATTCCCGTGGgAGACATTTACACGGTCAAACGTACTATGACCGCATCGCAGCCGAGACGGGTTGTTTCGAGTGCAGC
TGACACATGGCATGCTTTCGCTCGGTTCCGTATGCAACATTGAAGACCGCAGTCGATCGGACGCCCTTCAATTTTGTATTACCAGT
CATTAGCACTTGCACGGATTCCCCGAGCGGACGGTGTTCCTCAGGATAACCCACAGAGACTTGTTCAGGCTGGTAAAGTGGCG
AACGTACCATTTCGTAACCGGCGATTGTGACGACGAAGGACCCCTCTTCTCCCTGGCAAATCTCAACGTCACTACCACAGTCAGGT
CCGGACTTcaCATCAAGACCTTCTTcaTGCCCAATCAACCAACGCTGAAGTGGAcCAAATGTTGAACCATTATCCACTAGACCTCA
CACAAGGCTCTCCGTTTCGATACAGGCATTCTGAATGCTTTGTcaCCGCAGTTCAAGCGGCTCGCTGCATTTCCAAGGGGACGCCGTC
TTCCAAGCACGACGATTCTTCTACAGCAACGCTCTGGCAAACAAAACACATGGGCTTTCCTCAGCAAGCGATTCAAGGTTGC
CCCTTTCTCGGCTCGTTCCACGATCCGACATTCTCAATGTGACTTCGGCGGCGAGCTCGGGGACTACTCATCAATTTTCGTGA
ACAACTCGATCCAAATGGCCAAGGGCGTGAATCAACTGGCCAAATACACCACGTCGTCGCGGAACCTAGTGACCTTCAACGAC
AACCTCCTGTTCCCGTTACGATCACTCAAGACACTTTCAGAACAGACGCCATCAACTTTTTGACTGGTGTGACTCTGGCAAATCC
ACTTTGAAGGAACTTTGGGGCTTATTTATTTACGGTCACTTACATCTAAATGTATTATATTCATATTCGCGGGGTTGCTGTTT
CGGTGATATGACGTTACGAGGAAGTCGCACAGTAGGCACATTGTCTATATCCAGCATGTACCAATTTGGACCGCAGCGATCAGCA
TAACACTGCTGTAAAAAAGATAGTTCGTGGTCTAAAAAATAAAAAAAAAA

```

```

MFVFLQAVLGLFAIQTAATPLPRANSVTLDSATFTGTTSGRVTKFLGIPYAQPPTGDRRFRLEPEIPPYTGTVRATAFGPACPQQS
ARLPLPDGLASDVVDLIVNTAYKAVFPDNECLINVVVPTSATPTSKLPVAVWIFGGGFELGSPSLYDGLLIVERSIQLGEPVIY
VSMNYRLSAFGLASQEVKDTGVGNLGLQDQREALRWIKYISSFGDPKVTIWSAGAI SVALHVMANNGNHEGLFRGAFMQS
GSPIPVGDISHGQTYDYDAIAAETGCSSAADTLACLRVSPYATLKTAVDRTPFIIFYQSLALARI PRADGVFLTDNPQLVQAGKVA
NVPFVTGDCDEGLTFLSLANLNVTTTSQVRTYIKTFMPQSTNAELDQMLNHYPLDLTQGSFPDGTGILNALSPQFKRLAAFQGDV
FQAPRRFFLQQRSGKQNTWAFLSKRFKVAPFLGSGFHASDILNVYFGGELGDYLINFNVNLDPNQGRGINWPKYTTSSPNLVTFND
NLLFPVTTITQDTRFDAINFLTGVTLANPL*RELWGLFISRLTS*MYIHIRGVAVSVI*RYEEVAQ*ALLSISSMYQFGPQRSA
*HCKKDSWSKKKKKX

```

Abbildung 4.36: cDNA- und Aminosäuresequenz der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* (Q5W281). Start- und Stoppcodon sind fett, Signalsequenz ist unterstrichen

Durch *Primer Walking* wurde die Gesamtsequenz der cDNA mit einer Länge von 1861 bp ermittelt (Abb. 4.36). Die Aminosäuresequenz besaß maximale Homologien von 53 bis 56% ausschließlich zu Lipasen aus *C. cylindracea* bzw. *C. rugosa* (Tab. 4.14).

Tabelle 4.14: Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der Xanthophyllesterase

	Accession number	Quelle	Länge [bp]	Homologie [%]	E-Wert	Literatur
1	X16712	<i>C. cylindracea</i> , Lipase 1	1657	55,51	3,9 ⁻²³	Kawaguchi <i>et al.</i> , 1989
2	X66008	<i>C. cylindracea</i> , LIP5 Gen	1812	53,8	6,6 ⁻²³	Lotti <i>et al.</i> , 1993
3	X64703	<i>C. cylindracea</i> , LIP1 Gen	1733	55,51	2,8 ⁻²²	Longhi <i>et al.</i> , 1992
4	X66006	<i>C. cylindracea</i> , LIP3 Gen	1855	53,14	1,2 ⁻²⁰	Lotti <i>et al.</i> , 1993
5	AY464467	<i>C. cylindracea</i> , Lipase mRNA	1647	53,84	1,2 ⁻²⁰	-
6	X64704	<i>C. cylindracea</i> , LIP2 Gen	2043	52,92	1,4 ⁻²⁰	Longhi <i>et al.</i> , 1992

Die kodierende Sequenz verfügte eine Länge von 1641 bp bzw. 547 Aminosäuren. Aufgrund der ermittelten Edman-Sequenz des reifen Proteins wurde der Unterschied von 22 Aminosäuren zum Translationsstartsignal als Exportsignalsequenz

identifiziert. Das Protein besaß ein berechnetes Molekulargewicht von 56,7 kDa. Die charakteristischen Daten des Enzyms sind in der Tabelle 4.15 zusammengefasst.

Tabelle 4.15: Charakterisierung der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* (Zorn et al., 2005a)

Accession number	MW nativ [kDa]	MW denaturiert [kDa]	MW berechnet [kDa]	IEP	Temperatur-optimum [°C]	pH-Optimum
Q5W281	430	54,9	56,7	4,5	40	5,8

In einem Alignment mit der Lipase 2 aus *C. rugosa* sind die wiedergefundenen, tryptischen Peptidsequenzen und konservierten Aminosäuren der katalytischen Triade dargestellt (Abb. 4.37).

<i>P. sapidus</i>	MFFVLQAVLGLFAIQTAATPLPR ANSVTLDSATFTGTTSGRVTKFLGI PYAQPPPTGDRRF 60
<i>C. rugosa</i>	-----MKLCLLALGAAVAAAPTATLANGD--TITGLNAIVNEKFLGIPFAEPPVGTLP 52
	: :::: * *: *: *: * . . . * * : * * * . : * * * * : * * * * : * * *
<i>P. sapidus</i>	RLPEPIPPYTGTVRATAFGPACQQSARLPLPDGLASDVVDLIVN-TAYKAVFPDNECL 119
<i>C. rugosa</i>	KPPVPYSASLNGQQFTSYGSPCMQMNPMGSFEDTLPKNARHLVLQSKIFQVVLPNDEDCL 112
	: * * . . . : * : * * * * * . . . : * * * : : : . . : : * : * : * * * *
<i>P. sapidus</i>	SINVVVPTSATPTSKLPVAVWIFGGGFELGSPSLYDGGGLIVERSIQLGEPVIYVSMNYRL 179
<i>C. rugosa</i>	TINVIRPPGTRASAGLPLVWLWIFGGGFELGGSSLPFGDQMVAKSVLMGKPVIVSMNYRV 172
	: * * : * . : . : : * * : * * * * * * . * * : * . : * : * : * : * * * : * * * * :
<i>P. sapidus</i>	SAFGFLASQEVKDTGVGNLGLDQREALRWIQKYISSFGGDPTKVTIWGE S AGAISVALH 239
<i>C. rugosa</i>	ASWGFLAGPDIQNEGSAGLHLDQRLAMQWVADNIAGFGGDPKVTIYGE S AGSMSTFVH 232
	: : * * * * . : : : : * * * * * * * * * : : . * : . * * * * : * * * * * * : : * . *
<i>P. sapidus</i>	MVANNG---NHEGLFRGAFMQSGSPIPVG--DISHGQTYDYDAIAAETGCSSAADTLACL 293
<i>C. rugosa</i>	LVWNDGDNTYNGKPLFRAAIMQSGCMVPSPDVPDGTYGTEIYNQVVASAGCGSASDKLACL 292
	: * * : * * * : * * : * * * * . * . * : : * * * : : * . : * * * * * : * * * *
<i>P. sapidus</i>	RSVPYATLKTAVDRTPFIFDYQSLALARIPR ADGVFLTDNPQR L [▼] VQAGKVANVPFVTGDC 353
<i>C. rugosa</i>	RGLSQDTLYQATSDTPGVLAYPSLRLSYLPRPDGTFITDDMYALVRDGYAHVPIIGDQ 352
	* . . * * * . * . * * : : * * * * : * * * * * * : * * : * * * * * : * *
<i>P. sapidus</i>	D EGTLFSLANL N VTTTSQVRYIKFTFFMQSTNAELDQMLNHYPLDLTQGSFPDGTGILN 413
<i>C. rugosa</i>	N DEGTLFGLSSL N VTTDAQARAYKQSFHAS-DAEIDTLMAAYTSDITQGSFPDGTGIFN 411
	: * * * * * . * : * * * * * * : * . * * : * * * * : : * . * : * * * * * * * * *
<i>P. sapidus</i>	ALSPQFKRLAAFGQDAVFQAPRRFFLQQRSGKQNTWAFLSKRKFVAPFLGSGF H ASDILNV 473
<i>C. rugosa</i>	AITPQFKRISALLGDLAFTLARRYFLNYYQG-GTKYSFLSKQLSGLPVLGTFF H GNDDIIWQ 470
	* : * * * * * : * : * * * . * . * * * * : * . . . : * * * * * . . * * * * * * * * :
<i>P. sapidus</i>	YFGGELGDYLIN----FVNNLDPNGQGRGINWPKYTTSSPNLVTFNDNLLFPVITITQDT 528
<i>C. rugosa</i>	DYLVGSGSVIYNNAFIAFANDLDPNKAGLWTNWPTYTSSSQSGNNLMQINGLGLYTGKDN 530
	: * . : * * * * * * * * * * * . . . : : : : : * :
<i>P. sapidus</i>	FRTDAINFLTGVTLANPL 546
<i>C. rugosa</i>	FRPDAYSALFNSPPSFFV 548
	* * . * * . * . . : :

Abbildung 4.37: Alignment der Xanthophyllesterasesequenz (Q5W281) mit der Lipase 2 aus *C. rugosa* (P32946). Edman-Sequenz ist fettgedruckt, Peptide 1-5 sind unterstrichen, Peptid 4 ist unterstrichen und fettgedruckt, potentielle N-Glykosidierungsstellen sind fett und kursiv, konservierte Aminosäuren der katalytischen Triade: ▼; ClustalW

4.2.5 Hypothetisches 3D-Modell der Xanthophyllesterase

Die Xanthophyllesterase gehört zu dem 3D-Strukturtyp der α/β -Hydrolase-Faltung. Charakteristisch für diesen Typ ist die parallele Anordnung von mehreren β -Faltblättern, umgeben von α -Helices (Abb. 4.38).

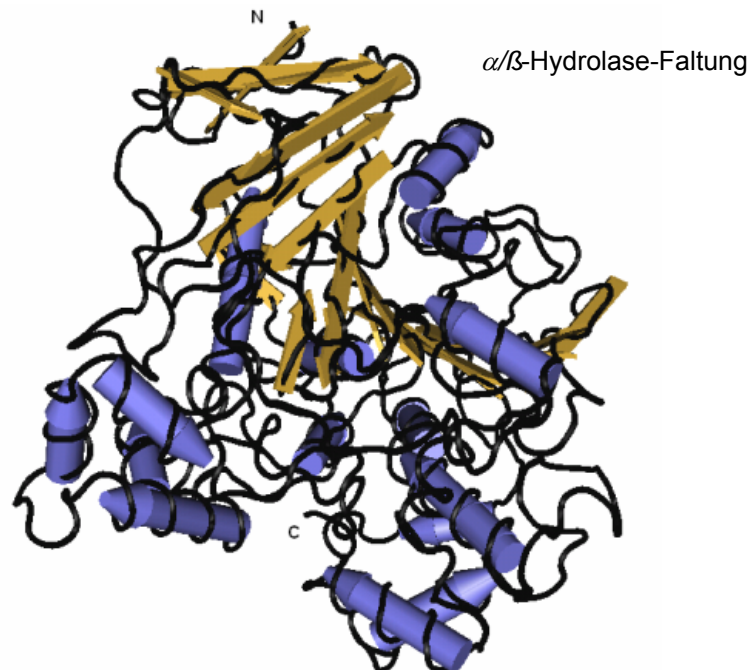


Abbildung 4.38: 3D-Modell der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*. α -Helices blau, β -Faltblätter gelb, N: N-Terminus, C: C-Terminus, SWISS-MODEL

Die Struktur des Proteins besteht aus 11 β -Faltblättern und 16 beide Seiten umgebende α -Helices, wobei andere bekannte Lipasen über sechs bis neun parallele β -Faltblattstrukturen verfügen (Kim *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 1996; Noble *et al.*, 1993).

4.3 Isolierung der cDNA einer Peroxidase aus *P. sapidus* (EC 1.11.1.16)

Aus dem nahen Verwandten *P. eryngii* sind zwei polyvalente Peroxidasen bereits bekannt. Ein Vertreter dieser neuartigen Gruppe ligninolytischer Enzyme, die weder den Lignin-, noch den Manganperoxidasen zuzuordnen ist, sollte mittels Koloniehybridisierung aus dem nahen Verwandten *P. sapidus* isoliert werden (s. Kapitel 3.2.2.8).

4.3.1 Koloniehybridisierung

Für die Konstruktion einer DNA-Sonde wurde das folgende Alignment aus den Aminosäuresequenzen der polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii* und einer Manganperoxidase aus *P. ostreatus* herangezogen (Abb. 4.39).

VPL1	MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRATCADGRTTANAACCVLFPIILDDIQENLFD	60
VPL2	MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRATCDDGRTTANAACCILFPILDDIQENLFD	60
MnP2	MAFAKLSALVLAALGATVALG---APSLNKRVTGATGQTTANEACCALFPILEDIQTNLFD	57
	: .****.*****:* :. . * :*:** * :***** ** *****:*** **	
VPL1	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTL-----GGGGADGSIIFDFTIETNFANAGIDEI	114
VPL2	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTL-----GGGGADGSIIFDFTIETNFANAGIDEI	114
MnP2	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIFSPALTNAGQFGGGADGSMIIFSDTEPNFANLGLIDEI	117
	*****:*****:***:* *****:* * . * ** ** *****	
VPL1	VSAQKPFVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPPGGVRIIPFFLGRPDAVAASPDHLVPEPFDS	174
VPL2	VSAQKPFVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPPGGVRIIPFFLGRPDAVAASPDHLVPEPFDS	174
MnP2	VEAQKPFVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCAPAPRLNFFLGRPDATQIPDGLVPEPFDS	177
	*.*****:*:*****.******.*****. * : *****. . ** *****	
VPL1	VDSILARMSDAGFSPVEVWLLASHSIAAADKVDPSPGTPFDSTPGVFDSPQFFIETQLK	234
VPL2	VDSILARMGDAGFSPVEVWLLASHSIAAADKVDPSPGTPFDSTPGVFDSPQFFIETQLK	234
MnP2	VDKILSRMGDAGFSTVEVWLLSHTIAAADLVDPSPGTPFDSTPSTFDSQFFLETMLQ	237
	** .**:* .*****.*****:*:***** ********** . *****:* * :	

Abbildung 4.39: Ausschnitt des Alignments der Aminosäuresequenzen verschiedener Peroxidasen aus Basidiomyceten. VPL1 und VPL2: polyvalente Peroxidasen aus *P. eryngii* (Q9UR19 und O94753), MnP2: Mangan-Peroxidase aus *P. ostreatus* (Q9UVY8), Bereich der Sondensequenz ist hervorgehoben, ClustalW

Die amplifizierte Gesamt-cDNA aus *P. sapidus* wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1TOPO ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert. Die gewachsenen Klone von insgesamt acht Platten wurden auf eine N+ Nylon-Membran (Hybond, Amersham) transferiert, die Zellen durch die Zugabe von NaOH lysiert und die DNA auf der Membran fixiert.

Tabelle 4.16: DNA-Sonde und *Primer* zur Isolierung der cDNA-Sequenz der Peroxidase aus *P. sapidus*

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
8279	Sonde 95	5'>TTCGGC(AT)(AC)CGGTCG (CT)CG(CT)ATTTGCCCCG<3'	92,9°C
0009	PSA Peroxid for 64	5'>CCG AGG TAC ACG GGG AAG AT<3'	64,0°C
0010	PSA Peroxid rev 64	5'>TAC ATA TAC ACG GTT GTC ACA GT<3'	64,0°C

Degenerierte Oligonukleotide, die kovalent direkt an eine alkalische Phosphatase gebunden sind, und deren Sequenzen von Konsensusregionen abgeleitet wurden, wurden als DNA-Sonden eingesetzt (Tab. 4.16; AlkPhosDirect, Amersham).

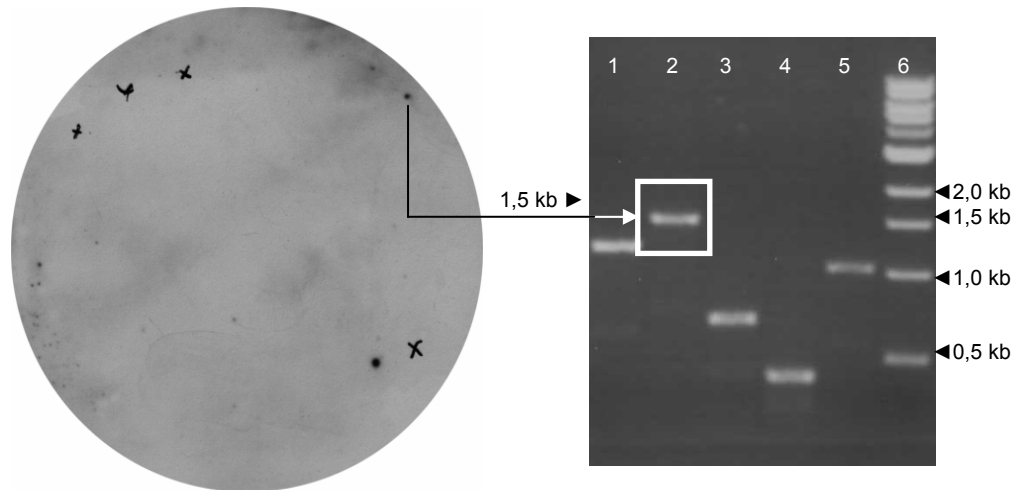


Abbildung 4.40: Koloniehybridisierung zur Isolierung der cDNA einer Peroxidase aus *P. sapidus* (Spur 2). N+ Nylon-Membran (links) und Auftrennung der Inserts im Agarosegel (rechts), 1-5: Inserts verschiedener Klone, 6: Marker

Die Detektion erfolgte durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit dem künstlichen Substrat CDP-Star (Amersham), ein chlor-substituiertes 1,2-Dioxetan. Bei dieser Chemilumineszenzreaktion erfolgte nach enzymatischer Dephosphorylierung des Substrates eine Lichtemission bei 466 nm, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde (Abb. 4.40).

Die Stringenz ist abhängig von der Temperatur der Hybridisierung und der ersten Waschschriffe. Die zu verwendende Temperatur leitete sich aus der Länge und der Sequenz der Sonden ab.


```

AGCGTGGTCGGCGCCGAGGTACACGGGGAAGATCCCCAGTCTTACAATCTCCTGCAATGTCCTTCAAGACGCTCTCTGCTCTTGTA
CTTGGCGCTCGGCGCCGCTGTCCAGTTCACCAGTGTGCTGTCCCTCGTGTCCAGAAAACGCGCCACTTGGCGTGACGGACGTACCAC
CGCGAATGCTGCATGTTGGCTTCTGTTCCCATCCTCGATGACATCCAAGAAAACCTGTTGACGGCGGACAGTGGGAGAAGAGG
TCCACGAGTCTCTACGTTTGACTTTCACGACGCAATCGGTTTCTCTCCACTTTAGGCGGAGGAGGAGCTGACGGCTCCATCATT
ACATTCGATACCATTGAGACCGTTTTCCCGCCAATGCGGGCATCGATGAAATTGTCAGTGTCTCAGAAACCATTCGTGGCTAAGCA
CAACATCTCCGCGCCGACTTCAATTCGCTGGCCGTGTTGGAGTCTCCAACCTGCCCTGGTGGTGTAGGATTCCTTCTTCT
TGGGTCGCCCGGATGCCGTGGCCGCTCCCGAGACCCTCGTGCCAGAGCCTTTCGACTCCGTCGACACTATTCTTGCCAGAATG
GGTGACGAGGCTTCAGTCCGTCGAGGTTGTTGGCTTCTGGCTTCGCACTCTATTGCTGCTGCCGACTGGTTGACCCATCGAT
TCCTGGAACACCGTTCGATTCACCCAGGCGTCTTGGATTCTCAGTTCCTCATCGAAACGCAACTAAAGGCAGGCTCTTCCAG
GTACTCCTGATAACAAAGGAGAAGTCCAGTCCCATTCGCAAGGAGAAATCAGGCTTCAATCCGACATTTGTTGGCTAGAGACCC
CAGACTCGCTGCGAGTGGCAGTCCATGGTTAATAATCAACCGAAGATTCAGAACCCTTTCGCCGCCACCATGTCGAAGATGGCTCT
TCTTGGCCAAGACAAGAGCAAACCTGATCGACTGTCTGATGTTATCCCACTCCCCCTGCCCTTGTGCGAGCGGCCACTTGGCCG
CGGGATTTCTCTTAGCGATGTTGAGCAAGCGTGCGCCGAGACACCTTCCCTGCTCTTACTGCCGACCCAGGCCAGTACTCC
GTCCCTCCCGTCCCTGGATCGTAAATGCTTCCATACCCGAACGTGTTCCGTTCTGTTGTTGATTTCATGGATTTGATCCGA
TTCTAGATGACTGTGACAACCGTGTATATGTAATGATCTCTGTGAAGTATACTTTCTTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

RGRGRGTRGRSPVLQSPAMSFKTL SALV LALGAAVQFTSAAVPRVQKRATCADGRRTANAACCVLFPILDDIQENLFDGGQCGEEV
HESLRLTFHDAIGFSPTLGGGADGSIITFDTIETVFPANAGIDEIVSAQKPFVAKHNI SAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRI PFFL
GRPDAVAASPDHLVPEPFDSVDTI LARMGDAGFSAVEVVWLLASHSIAADLVDP SIPGTFDSTPGVFD SQFFIETQLKGR LFP
TPDNKGEVQSPLQGEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQDKSLIDCSV IPTPPALVGA AHLPA
GFSLSDVEQACAETFPFALTADPGPVTSVPPVPGS*MLPYPNVFVLLL*FSIGFVSDSR*L*QPCICK*SL*SILFFCKKKKKK

```

Abbildung 4.41: DNA- und Aminosäuresequenz der Peroxidase aus *P. sapidus* (Q4QZ27). Start- und Stopp-Codons sind fettgedruckt, die konservierte Aminosäuresequenz zur Ableitung der Sondensequenz ist unterstrichen

Mit flankierenden Vektorsequenzen und nichtkodierenden Bereichen wies das Insert eine Länge von etwa 1,5 kb auf, die isolierte cDNA hatte ein offenes Leseraster von 1083 bp. Die übersetzte Sequenz umfasste 361 Aminosäuren und besaß ein berechnetes Molekulargewicht von 37,8 kDa (Abb. 4.41). Die größte Homologie von 91 bzw. 90% zeigte die cDNA-Sequenz zu den Isoenzymen der polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii* (Tab. 4.17; Ruiz-Duenas *et al.*, 1999a).

Tabelle 4.17: Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der Peroxidase aus *P. sapidus*

	Accession number	Quelle	Länge [bp]	Homologie [%]	E-Wert	Literatur
1	AF007221	<i>P. eryngii</i> VP	1254	90,66	0	Ruiz-Duenas <i>et al.</i> , 1999a
2	AF007222	<i>P. eryngii</i> VP	1224	90,40	0	Ruiz-Duenas <i>et al.</i> , 1999a
3	AB011546	<i>P. ostreatus</i> MnP	1224	70,97	4 ⁻¹⁴	Irie <i>et al.</i> , 2000
4	U21879	<i>P. ostreatus</i> MnP	1086	67,31	7,2 ⁻¹³	Asada <i>et al.</i> , 1995
5	AY836676	<i>P. pulmonarius</i> MnP	1219	66,76	1,5 ⁻¹²	-
6	AM397950	<i>Phlebia tremellosa</i> LiP	915	62,79	1,3 ⁻⁷¹	-
7	L08963	<i>P. chrysosporium</i> LiP	1294	61,89	2,4 ⁻⁶⁰	Reiser <i>et al.</i> , 1993

Die Homologien mit Manganperoxidasen aus anderen *Pleurotus*-Spezies (67-71%) und mit Ligninperoxidasen aus anderen Basidiomyceten (62-63%) waren deutlich geringer.

4.3.2 Phylogenetische Einordnung

Das Alignment zeigt die Peroxidasesequenz aus *P. sapidus* im Vergleich mit den beiden Sequenzen der polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii*. (Abb. 4.42).

VPL1	MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRATCADGRRTANAACCVLFPILDDIQENLFD	60
VPL2	MSFKTLSALALALGAAVQFASAAVPLVQKRATCADGRRTANAACCVLFPILDDIQENLFD	60
<i>P. sapidus</i>	MSFKTLSALVLAALGAAVQFTSAAVPRVQKRATCADGRRTANAACCVLFPILDDIQENLFD	60
	*****.*****.***** ***** ***** *****:*****	
	M M ▼d	
VPL1	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSIIAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQKP	120
VPL2	GAQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSIIAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQKP	120
<i>P. sapidus</i>	GGQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSIIITFDTIETVFPANAGIDEIVSAQKP	120
	*.*****:***** *****	
VPL1	FVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPPGGVRI PFFLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDSILA	180
VPL2	FVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPPGGVRI PFFLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDSILA	180
<i>P. sapidus</i>	FVAKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPPGGVRI PFFLGRPDVAASPDHLVPEPFDSVDTILA	180
	*****:***	
	▼p M	
VPL1	RMSDAGFSPVEVVWLLASHSIAAADKVDPSIPGTPFDSTPGVFDSPFFIETQLKGRLFPG	240
VPL2	RMGDAGFSPVEVVWLLASHSIAAADKVDPSIPGTPFDSTPGVFDSPFFIETQLKGRLFPG	240
<i>P. sapidus</i>	RMGDAGFSAVEVVWLLASHSIAAADLVDPSPGTPFDSTPGVFDSPFFIETQLKGRLFPG	240
	** .*****.***** *****	
VPL1	TADNKGEAQSPLQGEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQ	300
VPL2	TADNKGEAQSPLQGEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQ	300
<i>P. sapidus</i>	TPDNKGEVQSPLQGEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQ	300
	*.*****.***** *****	
VPL1	DKTKLIDCSDVIPTPPALVGA AHL PAFGSLSDVEQACAATPFPALTADPGPVTSVPPVPG	360
VPL2	DKTKLIDCSDVIPTPPALVGA AHL PAFGSLSDVEQACAATPFPALTADPGPVTSVPPVPG	360
<i>P. sapidus</i>	DKSKLIDCSDVIPTPPALVGA AHL PAFGSLSDVEQACAETPFPALTADPGPVTSVPPVPG	360
	** .*****.***** *****	
VPL1	S	361
VPL2	S	361
<i>P. sapidus</i>	S	361
	*	

Abbildung 4.42: Aminosäuresequenz-Alignments der polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii* VPL1 (Q9UR19), VPL2 (O94753) und *P. sapidus* (Q4QZ27). Häm-Liganden: ▼, distal (d) und proximal (p), Mn²⁺-Bindestellen mit M markiert, N-Glykosidierungsstellen sind fett und kursiv, ClustalW

Die verwandtschaftliche Beziehung der Peroxidasesequenz wurde durch das Phylogramm (Abb. 4.43) verdeutlicht. Als Basis hierfür dienten die Aminosäuresequenzen der Peroxidasen aus der FASTA-Datenbankrecherche (Tab. 4.17).

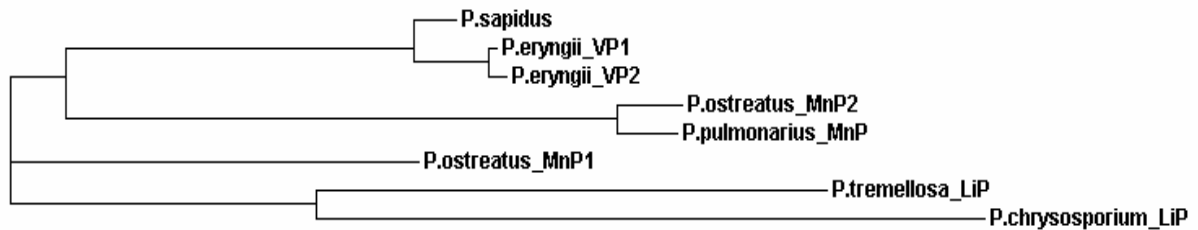


Abbildung 4.43: Phylogramm verschiedener Peroxidasen aus Basidiomyceten.

P. eryngii VPL1 (Q9UR19), *P. eryngii* VPL2 (O94753), *P. sapidus* (Q4QZ27), *P. ostreatus* MnP2 (Q9UUVY8), *P. pulmonarius* MnP (Q2VT17), *P. ostreatus* MnP1 (Q12332), *Phlebia tremellosa* LiP (Q08GD6), *Phanerochaete chryso sporium* LiP (Q06326). MnP: Manganperoxidase, LiP: Ligninperoxidase, VP: Versatile Peroxidase, ClustalW

4.3.3 3D-Strukturvergleich der Peroxidasen aus *P. sapidus* und *P. eryngii*

Anhand der Gesamtsequenzen der polyvalenten Peroxidasen aus *P. sapidus* und *P. eryngii* wurden dreidimensionale Modelle berechnet und miteinander verglichen (Abb. 4.44).

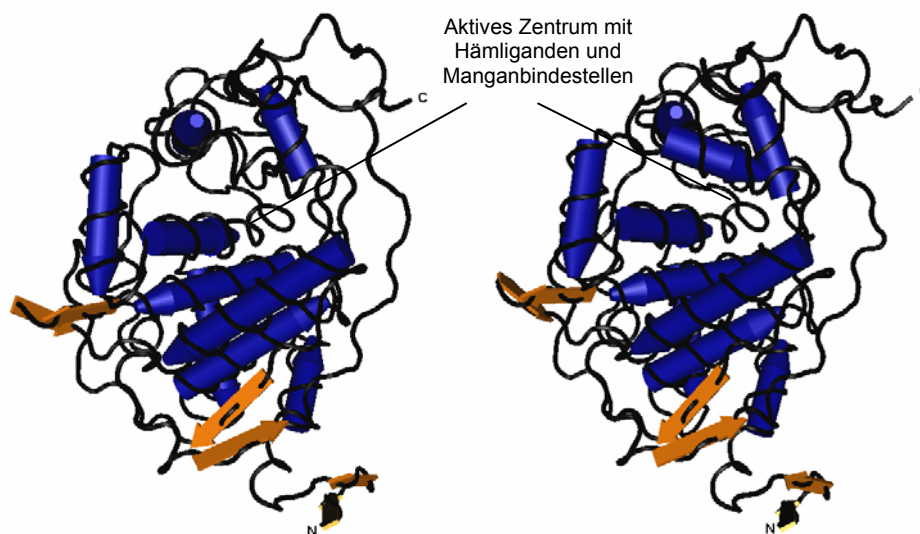


Abbildung 4.44: 3D-Modelle der polyvalenten Peroxidasen aus *P. sapidus* (links) und *P. eryngii* (rechts). Aktives Zentrum mit konservierten Hämliganden und Manganbindestellen ist hervorgehoben, C: C-Terminus, N: N-Terminus, SWISS-MODEL

Das Modell der Peroxidase aus *P. sapidus* beinhaltet ebenso wie die polyvalente Peroxidase VPL1 (Q9UR19) aus *P. eryngii* neun α -Helices und sechs β -Faltblattstrukturen (Ruiz-Duenas *et al.*, 1999b). Beiden Enzymen ist darüber hinaus die zentrale Lokalisierung der Hämbindestellen im katalytischen Zentrum gemein, sie verfügen über eine hohe strukturelle Ähnlichkeit.

4.4 Laccasen aus *P. sapidus* (EC 1.10.3.2)

Neben Peroxidasen gehören Laccasen zu den am besten untersuchten ligninolytischen Enzymen aus Basidiomyceten. In vorherigen Arbeiten wurden die aus *Fed-Batch*-Kulturen von *P. sapidus* unter Verwendung von Erdnussschalen als ligninhaltiger Induktor und C-Quelle zwei Laccasen (Q6A1A1 und Q4VY49) durch entkoppelte 2D-Elektrophorese gereinigt und charakterisiert (Linke *et al.*, 2005). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde die cDNA der Laccase 1 (Q6A1A1, AJ786026) fast vollständig isoliert. Das korrespondierende Gen zur Laccase 2 (Q4VY49) wurde basierend auf Sequenzalignments und ESI-MS/MS-Peptiddaten durch PCR und *Primer Walking* aus einer cDNA-Bank von *P. sapidus* isoliert.

4.4.1 ESI-MS/MS, Sequenzalignments und Primerableitung

Nach tryptischen Verdau der Laccase 2 wurden die Peptidsequenzen von zwei Tochterionen mit 14 bzw. 20 Aminosäuren mittels ESI-MS/MS ermittelt (Abb. 4.45 und Tab. 4.18).

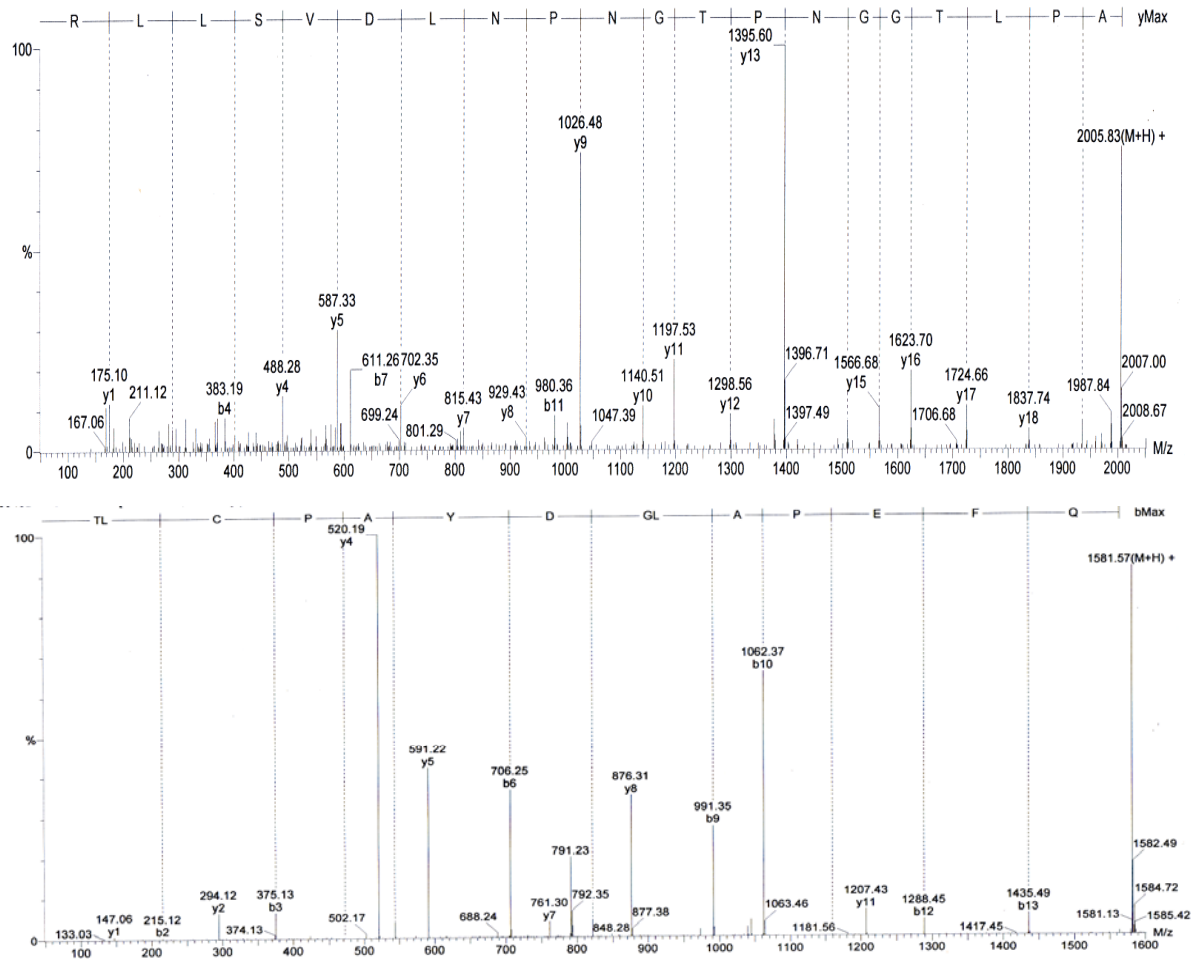


Abbildung 4.45: ESI-MS/MS-Spektren. Peptide 1 (oben, $M=2005,83$) und 2 (unten, $M=1581,57$) der Laccase 2 aus *P. sapidus* (Q4VY49)

Beide Sequenzen zeigten hohe Homologien zu einer Laccase aus *P. sajor-caju* (Pslac3; Q7Z8S4). Aus dem Vergleich mit dieser Sequenz ging ebenfalls hervor, dass es sich bei der Sequenz 2 um den C-Terminus handelt.

Tabelle 4.18: Molekülmassen und Aminosäuresequenzen tryptischer Peptide der Laccase 2 aus *P. sapidus*

	Sequenz	Aminosäuren	MH ⁺
1	APLTGGNPTGNPLDVSLLR	20	2005,8
2	TLCPAYDGLAPEFQ	14	1581,6

Zudem wurde ein Alignment von vier Aminosäuresequenzen verschiedener Laccasen aus Basidiomyceten herangezogen und die Codierung auf DNA-Ebene berücksichtigt (Abb. 4.46).

Pslac	MVLSTKLAALVASLPPFVLAATKKLDFHIRNDVVS PDGFERRAITVNGIFPGTPVILQKND	60
Popoxa3	MVLSTKLAALVASLPPFVLAATKKLDFHIRNDVVS PDGFERRAITVNGIFPGTPVILQKND	60
Pslac3	MVLSTKLVASLPPFVFAVTKKLDHFIRNDVVS PDGFERRAITVNGIFPGTPVILQKND	60
Ablcc2	MRFNFAVLVAACISSVLADTKTFNFDLVNTRLAPDGGFERDVTVINGEFPGLVQVNGKD	60
	* :*. :. :*.:. *:* ** :.:* : * :.:***** :.:*** ** ** * :.:**	
Pslac	KVQINTINELTDPGMRRTSIHWHGLFQHKTS GMDGSPFVNQCP IPPNSTFLYDFDFTAGQ	120
Popoxa3	KVQINTINELTDPGMRRTSIHWHGLFQHKTS GMDGSPFVNQCP IPPNSTFLYDFDFTAGQ	120
Pslac3	KVQIKTINELTDPGMRRTSIHWHGLFQHKTS GMDGSPFVNQCP IPPNTTFLYDFDFTAGQ	120
Ablcc2	SVRI PVNNKLTSS TMRRSVSIHWHGFFQARTSGQDGP AFVNQCP PNTTFTYEFSVADE	120
	.*: * :*:***. ****.*****:* :*** ***:***** ***:** * :*. :. :.	
Pslac	TGNYWYHSHLSTQYCDGLRGTFIVYDPNDPLKHLVDVDESTIITLADWYHDLAPHAQNQ	180
Popoxa3	TGNYWYHSHLSTQYCDGLRGSFIVYDPNDPLKHLVDVDESTIITLADWYHDLAPHAQNQ	180
Pslac3	TGNYWYHSHLSTQYCDGLRGSFIVYDPNDPLKHLVDVDESTIITLADWYHDLAPHAQNQ	180
Ablcc2	SGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFVYDPEDPLGHLYDVDETTVITLAEWYHVLAPDINNE	180
	:* :.:***** :.:*** ***:***** :.:*** ***:***** :.:*** ***. :.*	
Pslac	FFQTGSVPIPD TGLINGVGRFKGGPLVPYAVINVEQGKRYRFR LIQISCRPFFTF SIDNH	240
Popoxa3	FFQTGSVPIPD TGLINGVGRFKGGPLVPYAVINVEQGKRYRFR LIQISCRPFFTF SIDNH	240
Pslac3	FFQTGSVPIPD TGLINGVGRFKGGPLVPYAVINVEQGKRYRFR LIQISCRPFFTF SIDNH	240
Ablcc2	FFSSGII PVQDSGLINGKGRFNGGPETPF AVNVVEQGKRYRFR VIAISCRPFFTF SVDNH	240
	** :.* :* : * :***** ***:** * :*:***** :.:*** ***:***** :.:***	
Pslac	TFDAIEFDGIEHDPTPAQNIDIYAAQRAS IIVNANQTIDNYWIRAPLTGGNPAGNPNLDV	300
Popoxa3	TFDAIEFDGIEHDPTPAQNIDIYAAQRAS IIVHANQTIDNYWIRAPLTGGNPAGNPNLDI	300
Pslac3	TFDAIEFDGIEHDPTPAQNIDIYAAQRAS IIVNANQTIDNYWIRAPLTGGNPAGNPNLDV	300
Ablcc2	NLTFMEADSV EHD PVEIQNVDIYAAQRVSVILNANQPV DNYWIRAPMTGGNPDRNPNLNI	300
	. : * : * :*****. ** :*****. * :.:***. :***** ***:***** ***:**	
Pslac	SLIRAILRYKGAPAVEPTTVATT DGHKLNDAEMHPIAQEGPGLGTGPPDMAITL NIAQP	360
Popoxa3	SLIRAILRYKGAPAVEPTTVATTGGHKLND AEMHPIAQEGPGLGTGPPDMAITL NIAQP	360
Pslac3	SLIRAILRYKGAPAVEPTSVATTEGHKLNDAEMHPIAQEGPGLGTGPPDMAITL NIAQP	360
Ablcc2	SLTLAILRYKGAPEVEPTTVN-VPGHKLLDQEMHPIAQEGPGKLGDPDPKHITL NIAQP	359
	** ***** ***:** * :***** :.:*** ***:***** :.:*** *****	
Pslac	NPPFFDINGISYLSPSVPVLLQMLSGARKPQDFLPSEQV IILPANKLIEVSI PGAGAHPF	420
Popoxa3	NPPFFDINGISYLSPSVPVLLQMLSGARKPQDFLPSEQV IILPANKLIEVSI PGAGAHPF	420
Pslac3	NPPFFDINGISYLSPSVPVLLQMLSGARKPQDFLPSEQV IILPANKLIEVSI PGAGAHPF	420
Ablcc2	NAPFFDINGISYISPTV VLLQLLSGAKRPEDVLPSEQV IFFVPKNSLIEVNIPEGGAHPF	419
	* :***** :.:*** ***:***** :.:*** ***:***** :.:*** ***. ** *	
Pslac	HLHGHTFDIVRTS NSDVNLVNP RRDLVPINGGNTTFRFFSGNSGAWFLHCHIDWHLEA	480
Popoxa3	HLHGHTFDIVRTS NSDVNLVNP RRDLVPINGGNTTFRFFSGNSGAWFLHCHIDWHLEA	480
Pslac3	HLHGHTFDIVRVSN SDVNLVNP RRDLVPINGGNTTFRFFSGNSGAWFLHCHIDWHLEA	480
Ablcc2	HLHGHNFDVVLASND DTFNFVNP RRDLVPINGGNTTFRFFTDNPGAWFLHCHIDWHLEA	479
	***** :.* :* :*. :. :. :***** :.:*** ***:***** :.:*** *****	
Pslac	GLAVVFAERPAEVNDGEQAQIVTQDWR TLCPAYDGLAPEFQ	521
Popoxa3	GLAVVFAERPAEVNEGEQAQIVTQDWR TLCPAYDGLAPEFQ	521
Pslac3	GLAVVFAERPAEVNEGEQAQIVTQDWR TLCPAYDGLAPEFQ	521
Ablcc2	GLAIVFAEAPEDNVSGPQSQITPQDWL DLCEPYN AIEPEFQ	520
	** :***** * : * :* :*. :. :. :***** ***:***** ***:**	

Abbildung 4.46: Aminosäuresequenz-Alignment von Laccasen aus *P. sapidus* (Pslac: AJ786026), *P. ostreatus* (Popoxa3: Q96TR4), *P. sajor caju* (Pslac3: Q7Z8S4) und von *Agaricus bisporus* (Ablcc2: Q12542). Identifizierte Peptidsequenzen sind hervorgehoben, ClustalW

Die Bereiche, die den Peptidsequenzen 1 und 2 entsprechen und von denen die *Primer* abgeleitet wurden, sind hervorgehoben. Diese beiden Sequenzen eignen sich für die Ableitung von degenerierten Primern (Tab. 4.19). Daraus ergab sich eine theoretische Fragmentlänge etwa 711 bp (237 Aminosäuren).

Tabelle 4.19: Primer zur Isolierung der cDNA-Sequenz der Laccase 2 aus *P. sapidus*

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
6993	Lacc 2 for	5'>GCA GGT AAC CCC AAC CTG GA<3'	64,0°C
6994	Lacc 2 rev	5'>CAT CGT AAG CCG GGC AAA GT<3'	62,0°C
9558	PSA Lacc gesamt for 66	5'>AAG CCC CAC TTG AGA CAT TCT C<3'	66,0°C
9559	PSA Lacc gesamt rev 66	5'>GAA CAT GCA ACG GCT TTC ATT A<3'	62,0°C

4.4.2 PCR und *Primer Walking*

Im PCR-Screening ergaben die *Primer* Lacc 2 for und Lacc 2 rev eine schwache Bande im Bereich von etwa 650 bp. Diese Bande wurde ausgeschnitten, aus dem Agarosegel isoliert und als Template in einer erneuten PCR eingesetzt. Diese Reamplifikation zeigte bei vier Ansätzen mit unterschiedlichen Templatekonzentrationen im Agarosegel eine deutliche Bande, welche anschließend zur Sequenzierung in den Vektor pCR2.1-TOPO zwischenkloniert wurde (Abb. 4.47).

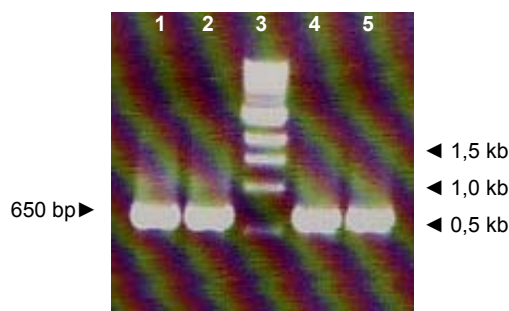


Abbildung 4.47: Reamplifikation zur Isolierung eines DNA-Fragments der Laccase 2 aus *P. sapidus*. *Primer* 6993 und 6994, 1-5: unterschiedliche Templatemengen (0,25; 0,5; 1 und 2 µL Agarosegeleluat), 3: Marker

Durch *Primer Walking* wurde die Gesamtsequenz der Laccase 2 isoliert. Von dem isolierten Fragment wurden wiederum *Primer* abgeleitet und diese mit den universellen Primern SMART 3 for und CDS 3 rev kombiniert.

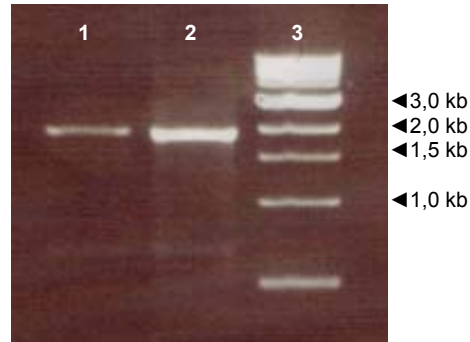


Abbildung 4.48: Amplifikation der Gesamtsequenz der Laccase 2 aus *P. sapidus* (AJ973225). Zwei verschiedene Templatemengen (0,5 und 1 μ L Gesamt-cDNA), 3: Marker

Die drei Teilsequenzen wurden unter Berücksichtigung der überlappenden Sequenzen aneinandergesetzt und erneut Oligonukleotide (*Primer* 9558 und 9559) zur Amplifikation der Gesamtsequenz konstruiert (Abb. 4.48).

```

ATGGTGCTCTCTACCAAGCTCGCTGCTCTTTGTGGCCTCGCTCCCTTTTGTCTTGCTGCGACAAAGAACTCGACTTCCACATT
CGAAACGACGTTGTCTCTCCGGATGGCTTCGAGCGCAGGGCAATCACAGTCAATGGTATCTTCCCTGGGACGCCCGTCATACTG
CAGAAGAATGACAAGTCCAGATCAACACAATCAACGAGCTGACGGACCCCGGCATGCGTTCGAGTACATCTATCCATGGCAC
GGTTTGTCCAAATAAACCTCCGGCATGGACGGGCTTCTTCGTCACACAGTGCCTGATTCCTCCCAATCTACTTTCCCTT
TACGATTTTCGATACCGCAGGACAGACCGGAACTATTTGGTATCACTCCCACTTGTCTACGCAATATTGCGACGGTCTTCGCGGC
ACTTTCATCGTTTATGATCCTAACGATCCTTTGAAGCATCTTTATGATGTTGATGATGAGAGCACTATCATCACCTTGGCTGAT
TGGTACCATGATCTTTGCTCCCCACGCTCAGAACCAATTTCTTCCAAACTGGTTTCGGTTCCAATTCCTGACACTGGCTTGATCAAC
GGTGTTCGGTCGATTTAAGGGTGGCCCACTTGTCCCTTACGCCGTAATTAATGTTGAGCAGGGCAAGCGGTACAGGTTCCGCCTC
ATCCAGATTTTCGTCGTCCTTCTTCCACTTCTCCATTGACAATCACACCTTCGATGCAATGAGTTCGATGGTATAGAGCAC
GACCCGACACCTGCACAGAATCGATATCTACGCTGCTCAACGTGCATCGATCATTGTCAACGCTAACCAGACCATCGACAAC
TACTGGATCCGTCACCGCTCACAGGGGAAACCCACAGGTAACCCCAACCTGGATGATCATTGATAGGGCCATCCTTCGA
TACAAGGGCGTCCCGCTGTGCAACCCACCACAGTCGCGACTACTGACGGGCACAAGCTCAATGATGCCGACATGCATCCCAT
GCTCAGGAAGTCCCGGAAACTTGGGCACCGGTCCCCAGACATGGCCATCACCTTGAACATGCTCAGCCTAACCCCTCCATTC
TTCGACATCAACGGGATATCGTATCTCTCCCTTCGGTCCCAGTGTTCGCTTACAGATGCTTAGCGGTGCTCGCAAGCCACAAG
TTCTCCCATCGGAAACAAGTCATCATCTTACCCGCTAACCAAGCTAATGAAAGTTTCTATACCCGGTGTGGTCCCATCCTTTC
CATTTGCACGGGCATACCTTTCGACATTGTCCGCACTTCAAAATAGCGATGTCGTTAACCTTGTAAACCACCCCGCCGACGCTG
CTGCCTATCAACGGCGGAAACACGACATTCGGTTCCTTCTCCGGCAACTCCGGTGCATGGTTCCCTTTCATTGTCATATTGACTGG
CATCTTGAAGCTGGTCTTGTCTTTCGCGCAACGACCTGCTGAAGTCAATGACGGCGAACAGGCACAAATCGTCACTCAA
GACTGGAGGACGCTTTGCCCGCTTACGATGGCCTCGCTCCTGAGTTCCAGTAAATAAGTAATTTGGATGCGGGCTGGTCTTTAC
ATTACGTTCCCTCCTTCACTATCCGTGACCTTTGAACAATAATACCATTCTTTTGGCAACTCCTATTATTGCTGTACATAT
AATGAAAGCCGTTGCATGTTTCGTCGTCAAAAAAAAAAAAA

```

```

MVLSTKLAALVASLFPVLAATKKLDFHIRNDVVSPDGFERRAITVNGIFPGTPVILQKNDKVQINTINELTDPGMRRTSIIHWH
GLFQHKTSMDGSPFVNQCPIPPNSTFLYDFDTAGQTGNWYHSHLSTQYCDGLRGTFFIVYDNDPLKHLVDVDESTITLAD
WYHDLAPHAQNQFFQTSVPIPDGTGLINGVGRFKGGPLVPYAVINVEQGKRYRFRLIQISCRPFFTFSIDNHTFDAIEFDGIEH
DPTPAQNIDIYAAQRASIVNANQITIDNYWIRAPLTGGNPTGNPNLDVSLIRAILRYKGAPAVEPTTVATTDGHLKLNADMHPI
AQEGPGLNLTGPPDMAITLNIQPNPFFFDINGISYLSVSPVLLQMLSGARKPQDFLPSEQVILPANKLIEVSI PGAGAHFP
HLHGHTFDIVRTSNSDVNVNLPVPRRDVLPINGGNTTFRFFSGNSGAWFLHCHIDWHLEAGLAVVFAERPAEVNDGEQAQIVTQ
DWRTLCPAYDGLAPEFQ*ISNWMRAGLYIQLPFILSVTFEQ*YHFFANSYCYCTYNESRCM

```

Abbildung 4.49: cDNA- und Aminosäuresequenz der Laccase 2 aus *P. sapidus* (Q4VY49). Sequenzen der tryptischen Peptide 1 und 2 sind unterstrichen, Start- und Stopcodon sind hervorgehoben (fett)

Die codierende Sequenz hatte eine Länge von 1563 bp (521 Aminosäuren) und besaß eine Homologie von 91% zu der Laccase 3 aus *P. sajor-caju* (AJ507326), deren Sequenz für die Primerableitung verwendet wurde (Tab. 4.20).

Aus der übersetzten Sequenz von 521 Aminosäuren wurde ein theoretisches Molekulargewicht von 57,4 kDa berechnet. Die tryptischen Peptide wurden in der Gesamtsequenz wiedergefunden (Abb. 4.49).

Tabelle 4.20: Ergebnis des FASTA-Datenbankvergleichs der Laccase 2 aus *P. sapidus*

	Accession number	Quelle	Länge [bp]	Homologie [%]	E-Wert	Literatur
1	AY836674	<i>P. pulmonarius</i> , Laccase 6 (lac6)	1768	90,74	0	-
2	AJ507326	<i>P. sajor-caju</i> , Laccase 3 (lac3)	1787	90,74	0	-
3	L10663	<i>A. bisporus</i> , Laccase (lcc2)	1658	65,79	3,9 ⁻¹⁴	Perry <i>et al.</i> , 1993
4	U44430	<i>T. versicolor</i> , Laccase 1 (lcc1)	1932	62,47	6,7 ⁻³²	Ong <i>et al.</i> , 1997

Die Laccase 1 besaß mit 56,7 kDa ein ähnliches Molekulargewicht. Die charakteristischen Daten der beiden Laccasen sind vergleichend in der folgenden Tabelle 4.21 zusammengefasst.

Tabelle 4.21: Vergleich der Laccasen 1 und 2 aus *P. sapidus*

Enzym	Accession number Protein	Aminosäuren	MW* [kDa]	Accession number cDNA	ORF [bp]	N-Glykosidierungsstellen
Laccase 1	Q6A1A1	531	56,7	AJ786026	1596	1
Laccase 2	Q4VY49	521	57,4	AJ973225	1563	4

Das Alignment vergleicht die Sequenzinformationen der Laccasen 1 und 2 auf Aminosäureebene. Die Sequenzen verfügten untereinander über eine Homologie von 46% (Abb. 4.50).

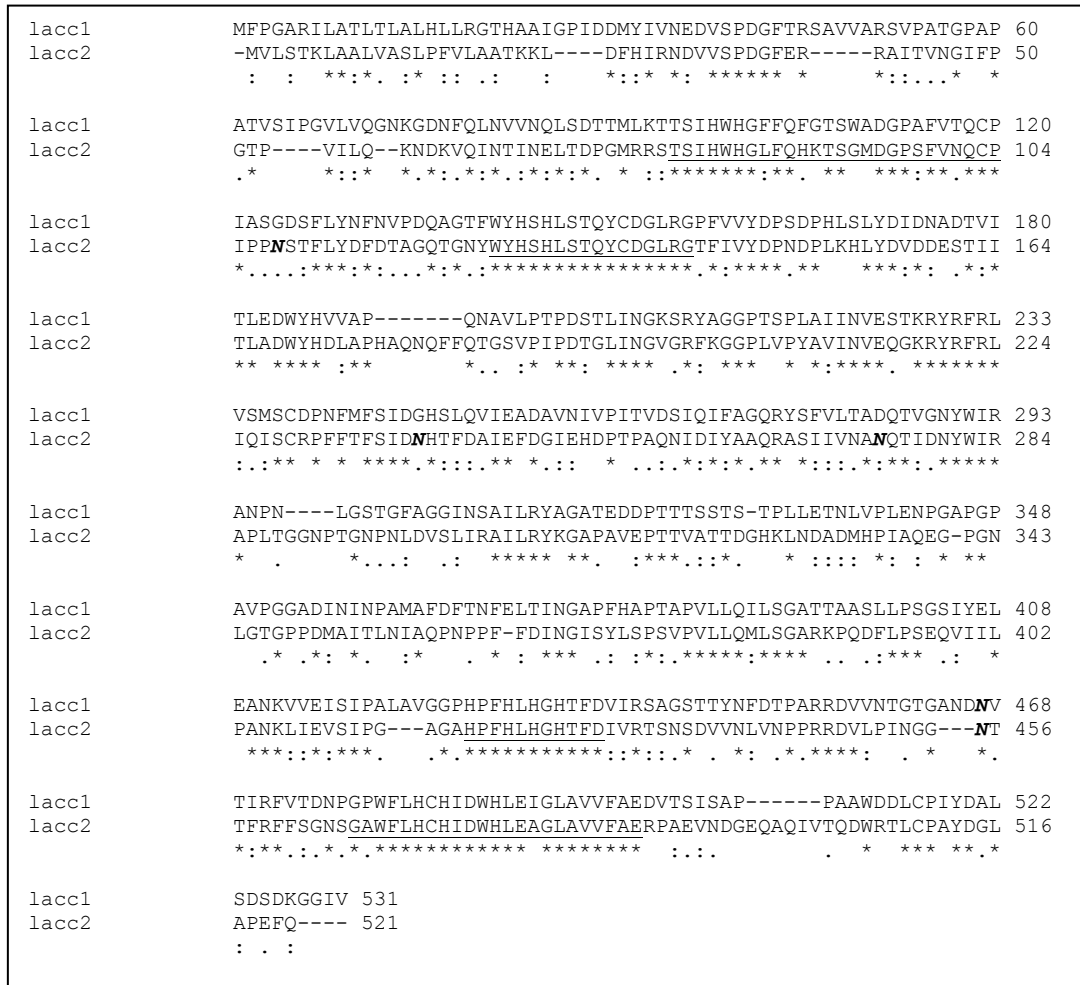
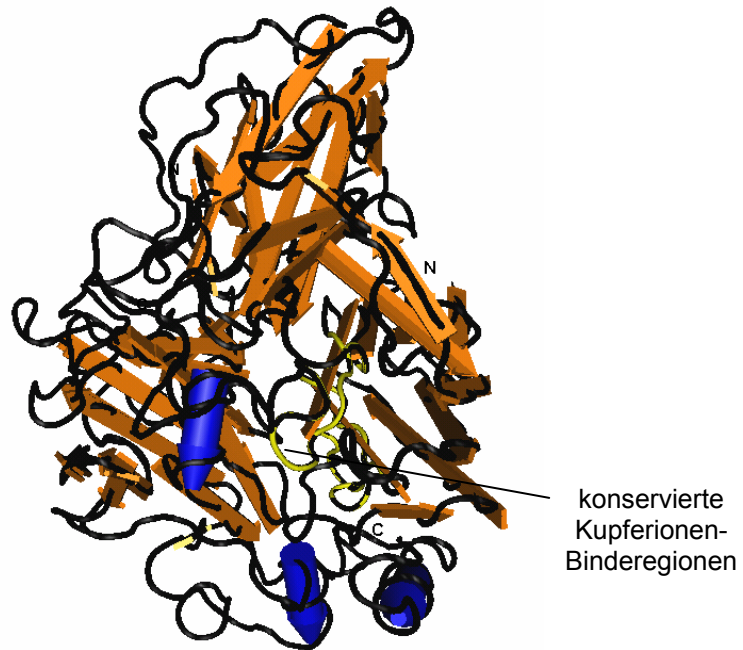


Abbildung 4.50: Aminosäuresequenz-Alignment der Laccasen 1 und 2 (Q6A1A1 und Q4VY49). Charakteristische Laccase-Motive L1-L4 sind unterstrichen, N-Glykosidierungsstellen sind fett und kursiv gedruckt, ClustalW

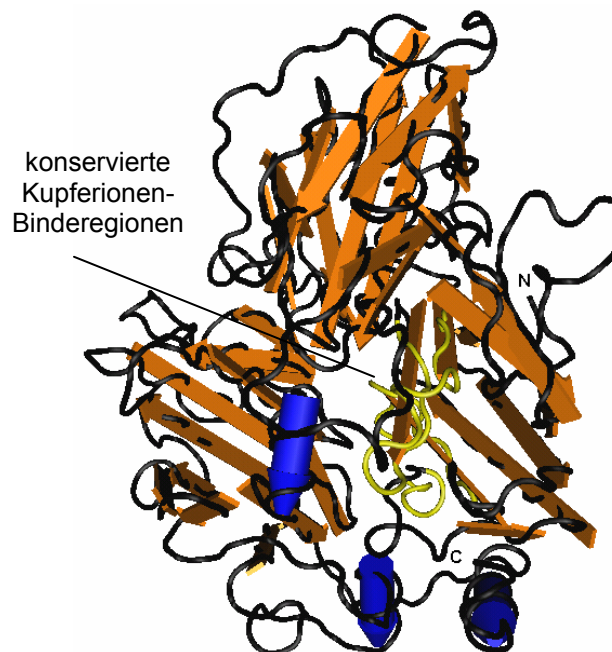
Die Kupferionen-Binderegionen L1 bis L4 der Laccasen sind in beiden Sequenzen hoch konserviert. Im Vergleich zur Laccase 1, die nur eine Glykosidierungsstelle besaß, verfügte die Laccase 2 über vier.

4.4.3 Hypothetische 3D-Modelle der Laccasen

Mit Hilfe der ermittelten Gesamtsequenzen der beiden Laccasen aus *P. sapidus* wurden dreidimensionale Modelle berechnet (Abb. 4.51 und 4.52).



**Abbildung 4.51: 3D-Modell der Laccase 2 aus *P. sapidus* (Q4VY49). N: N-Terminus;
C: C-Terminus, konservierte Kupferionen-Binderegionen sind
hervorgehoben, SWISS-MODEL**



**Abbildung 4.52: 3D-Modell der Laccase 1 aus *P. sapidus* (Q6A1A1). N: N-Terminus;
C: C-Terminus, konservierte Kupferionen-Binderegionen sind
hervorgehoben, SWISS-MODEL**

Die 3D-Modelle zeigten neben lediglich drei α -Helices drei charakteristische Domänen mit vornehmlich antiparallelen β -Faltblattstrukturen, in deren Mitte sich die konservierten Kupferionen-Bindestellen des aktiven Zentrums befanden. Trotz der geringen Sequenzhomologie von weniger als 45% besaßen beide Modelle eine hohe strukturelle Ähnlichkeit.

5. Diskussion und Ausblick

5.1 Das CyP450 Monooxygenasesystem (EC 1.14.14.1 u. a.)

Cytochrome P450 Monooxygenasen sind Hämthiolatproteine. Die Benennung basiert auf einem untypischen Absorptionsmaximum des reduzierten CO-Komplexes bei 450 nm. Das Häm-Eisen ist über die fünfte Koordinationsstelle mit dem Schwefel eines Cysteinrestes verbunden.

CyP450 sind ubiquitär vorkommende Schlüsselenzyme des oxidativen Metabolismus endo- und exogener lipophiler Substrate. Aus Pilzen ist eine Vielzahl an CyP450 Monooxygenasen bekannt (Abb. 5.1).

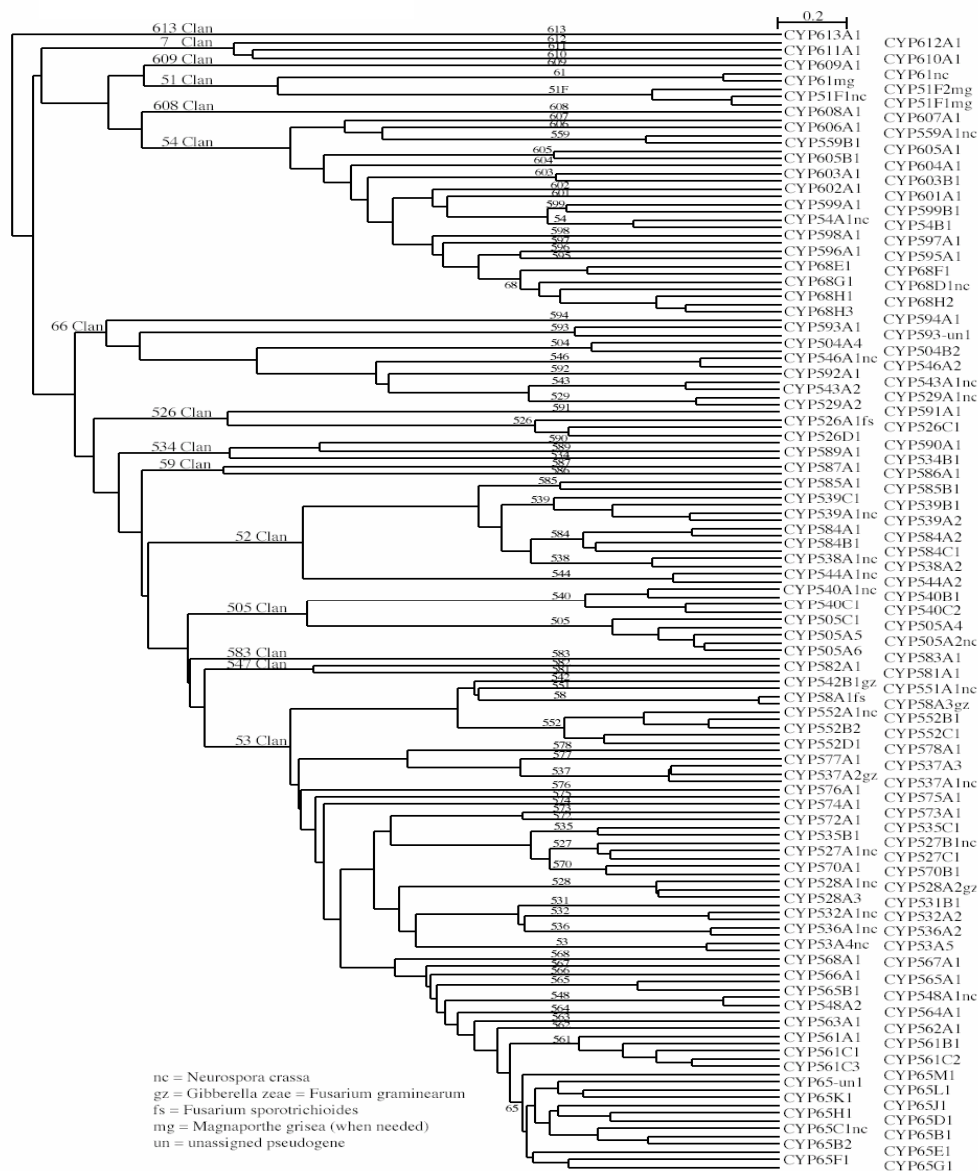


Abbildung 5.1: 148 Cytochrom P450 Monooxygenasen aus 78 Familien aus Pilzen.

(<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>)

Sie katalysieren die Übertragung von Sauerstoff auf nicht aktivierte aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe und die Epoxidierung von C-C-Doppelbindungen. Cytochrom P450 Monooxygenasen tragen als Enzyme des Fremdstoffmetabolismus durch Erhöhung der Wasserlöslichkeit zur Detoxifizierung von Xenobiotika bei. Sie unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer Substratspezifität, der Regio- und Stereoselektivität und liegen innerhalb eines Organismus oft in großer Vielfalt nebeneinander vor.

Die große Anzahl der katalysierten Reaktionen kann nicht durch wenige Isoformen bewältigt werden. Derzeit 6422 verschiedene Enzyme aus 708 Familien bekannt, wovon 1001 Monooxygenasen in 282 Familien aus Pilzen stammen (<http://drnelson.utmem.edu/P450.stats.2006.htm>; aktuellster Stand 23.10.2006).

CyP450 Monooxygenasesysteme können in drei biochemisch verschiedene Typen eingeteilt werden. Typ I beschreibt die mikrosomal gebundenen, unlöslichen Zweikomponenten-Systeme der Eukaryoten (Abb. 5.2). Sie bestehen aus einer NADPH-abhängigen P450 Reduktase und der korrespondierenden CyP450 Monooxygenase, während es sich bei der CyP450_{BM3} Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* um ein natürliches, lösliches Fusionsprotein aus Reduktase und Monooxygenase (Typ III) handelt. Ein ebenfalls in Bakterien, aber auch in Mitochondrien gefundenes Dreikomponenten-System besitzt neben der Reduktase und der Monooxygenase noch ein Eisen-Schwefel-Protein (Typ II).

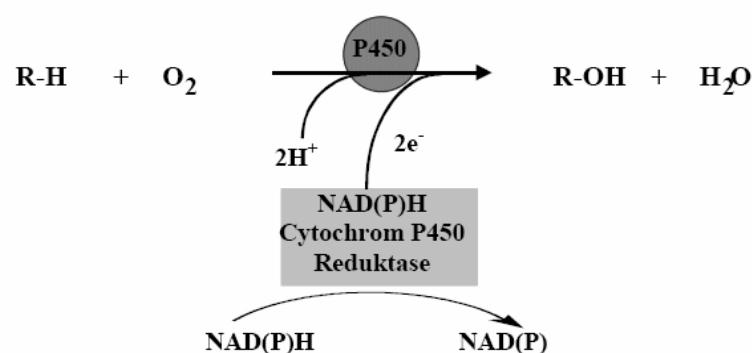


Abbildung 5.2: Zweikomponenten-System (Typ I) der CyP450 Monooxygenasen bei Eukaryoten (Lutz-Wahl, 1999)

Trotz des unterschiedlichen Aufbaus nutzen alle drei Systeme den gleichen Reaktionsmechanismus. Vom molekularen Sauerstoff wird ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen, das andere wird zu Wasser reduziert. Die

Reduktionsäquivalente werden vom Cofaktor NADPH über die P450 Reduktase bezogen.

NADPH-abhängige P450 Reduktasen sind ebenfalls membrangebundene, unlösliche Enzyme (Wang *et al.*, 1997), welche den Elektronentransport vom Cofaktor NADPH über die prosthetischen Gruppen Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) zur CyP450 Monooxygenase katalysieren.

Die bakterielle CyP450_{cam} aus *Pseudomonas putida* oxidiert den im Kiefernrohharz vorkommenden Monoterpenkohlenwasserstoff α -Pinen an allylischer Position zu Verbenol (Bell *et al.*, 2002), welches zum hochwertigen Aromastoff Verbenon weiteroxidiert werden kann (Abb. 5.3).

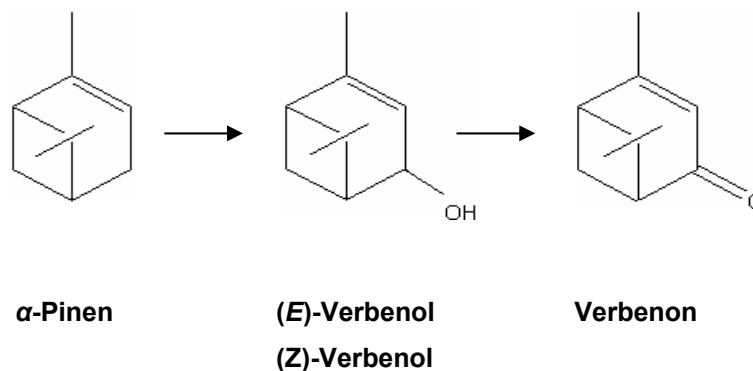


Abbildung 5.3: Zielprodukte der Biotransformation

Höhere Pilze, insbesondere Holz besiedelnde Basidiomyceten, sollten daher über eine geeignete Enzymausstattung zur Terpen-Oxidation verfügen und können als Quelle für oxyfunktionalisierende CyP450 Monooxygenasen herangezogen werden.

5.1.1 Stammscreening pinentransformierender Pilze

Da *P. sapidus* im Screening hinsichtlich der allylischen Oxidation von α -Pinen zu den aromaaktiven Oxidationsprodukten Verbenol und Verbenon das größte Biotransformationspotential zeigte, wurde dieser Basidiomycet für die Isolierung von cDNAs von CyP450 Monooxygenasen verwendet.

Um das biochemische Potential dieses Basidiomyceten für industrielle Prozesse nutzbar zu machen, mussten andere Möglichkeiten herangezogen werden, da die Umsatzraten begrenzt sind und Nebenprodukte entstehen (Hardebusch, 2006). Eine

Möglichkeit war die Isolierung der an der Biotransformation beteiligten P450 Monooxygenasen. Diese werden jedoch nur schwach exprimiert, zudem liegen sie intrazellulär und in Pilzen membrangebunden vor, was eine Reinigung deutlich erschwert (van den Brink *et al.*, 1998).

Die zweite Möglichkeit war die Isolierung beteiligter Gene und deren Expression in biotechnologisch relevanten Mikroorganismen. Für die Entwicklung eines Modellbioprozesses unter Einsatz molekularbiologischer Methoden wurden aus *P. sapidus* die cDNAs bisher unbekannter CyP450 Monooxygenasen isoliert.

5.1.2 Molekularbiologische Identifizierung höherer Pilze

Zu Beginn der Arbeiten wurde eine Identifizierung des Basidiomyceten auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt. Eine Identifizierung und Unterscheidung verschiedener *Pleurotaceae* wurde bereits beschrieben (Gonzalez und Labarère, 2000). Hierzu eigneten sich bei Basidiomyceten die mitochondrialen Gensequenzen der kleinen ribosomalen Untereinheit (Small Subunit: SSU) der rRNA (Abb. 5.4). Die variable Gensequenz der V6-Domäne wurde amplifiziert und sequenziert.

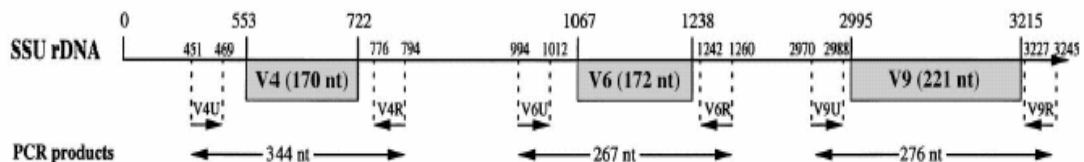


Abbildung 5.4: Sequenzabschnitte der variablen Domänen V4, V6 und V9 aus der mitochondrialen SSU rRNA Gensequenz von *Agrocybe aegerita* (Gonzalez und Labarère, 1998)

Die DNA-Sequenz der V6-Domäne besaß große Homologien von 91 bis 92% ausschließlich zu verschiedenen Vertretern aus der Familie der *Pleurotaceae* (s. Kapitel 4.1.2). Zwar besitzt die amplifizierte Sequenz die größte Homologie von 92% zu *P. sajor-caju* bzw. *P. pulmonarius*, jedoch unter Berücksichtigung der Gesamtlänge von 179 bp den geringsten E-Wert zu *P. sapidus*. Die Identität des Stamms DSMZ 8266 als *P. sapidus* wurde mit großer Wahrscheinlichkeit bestätigt.

5.1.3 Strategie zur Isolierung der cDNAs beteiligter CyP450

Bisher wurden CyP450-Gene lediglich aus sechs Basidiomyceten auf molekularer Ebene beschrieben (Tab. 5.1). Diese Klasse höherer Pilze besitzt eine große Anzahl verschiedener Gene. *Phanerochaete chrysosporium* verfügt, wie bei der Genomsequenzierung durch Homologievergleiche festgestellt wurde, über die bemerkenswerte Vielfalt von mindestens 150 verschiedenen CyP450-Monooxygenasegenen aus 12 Familien mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften (Yadav *et al.*, 2006). Dieser Basidiomycet besitzt ausgeprägte ligninolytische Eigenschaften, doch wurde im Gegensatz zu *P. sapidus* im Biotransformationscreening kein besonders hohes Oxidationspotential bezüglich des α -Pinens festgestellt.

Tabelle 5.1: Cytochrom P450 Monooxygenasen aus Basidiomyceten.

***aufgrund der Genomsequenzierung von *Phanerochaete chrysosporium* ist eine große Vielfalt von CyP450 Monooxygenasegenen bekannt, die in der Tabelle nicht darstellbar sind**

Organismus	Einträge bei EMBL-EBI	vollständige cDNA- bzw. Gensequenzen EMBL	Accession-number	Name des Gens	Familie	Referenz
<i>Coriolus versicolor</i> (<i>Trametes versicolor</i>)	1	1	AB057426.1	CYP512A1	CYP512A1	Ichinose <i>et al.</i> , 2002
<i>Lentinula edodes</i>	4	3	AB045779.1 AB049963.1 AB116638.1	Le.cyp1 Le.cyp2 Le. cypfb	CYP510A1 CYP510A3 -	Akiyama <i>et al.</i> , 2002 Akiyama <i>et al.</i> , 2002 Hirano <i>et al.</i> , 2004
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> *	31	15	-	-	-	Yadav <i>et al.</i> , 2006
<i>Agaricus bisporus</i>	5	2	AJ312129 Z82021	cyp cypA	- -	Eastwood <i>et al.</i> , 2001 De Groot <i>et al.</i> , 1997
<i>Coprinus cinereus</i>	14	1	AB013443	eln2	CYP502	Muraguchi und Kamada, 2000
<i>Heterobasidion annosum</i>	2	1	AY827553	HCY2	-	-

Um die cDNA der an der Pinen-Oxidation beteiligten Monooxygenasen zu isolieren, wurde folgende Strategie verfolgt. Die Submerskulturen wurden induziert, die Enzymaktivität mittels GC-Analytik erfasst und die mRNA zum Zeitpunkt der höchsten Produktbildung isoliert (s. Kapitel 4.1.3). Durch die anschließende Synthese subtraktiver cDNA wurden differentielle cDNAs angereichert und diese in einem PCR-Screening eingesetzt.

5.1.3.1 Induktion von Cytochrom P450 Monooxygenasegenen

Die Zugabe von α -Pinen zu wässrigen Submerskulturen von *P.apidus* birgt eine Reihe von experimentellen Schwierigkeiten. Bei Monoterpenkohlenwasserstoffen wie α -Pinen handelt es sich um flüchtige, schwer wasserlösliche Verbindungen. Durch die Oxyfunktionalisierung wird die Wasserlöslichkeit erhöht, allerdings kann ein Teil des Substrates über die Gasphase zuvor entweichen (logP α -Pinen: 4,44; logP Verbenol: 2,28; www.logp.com). Eine Verwendung von Emulgatoren verbessert zwar die Substratverfügbarkeit, erschwert jedoch die Extraktion der Produkte. Durch tägliche Zugabe von 1 mmol L^{-1} α -Pinen wurde die kontinuierliche Verfügbarkeit des Substrates sichergestellt.

Eine weitere Schwierigkeit stellte die geringe Stabilität des bicyclischen Monoterpens dar. Durch Autoxidation entstanden neben weiteren Oxidationsprodukten auch Verbenol und Verbenon (Moore *et al.*, 1956), so dass für jeden Ansatz biologische Blindwerte mitgeführt wurden.

Zudem störten aufgrund der Lipidlöslichkeit Terpene die Membranintegrität und wirken bei Konzentrationen ab 0,05 % cytotoxisch (van der Werf *et al.*, 1997). Durch die Dosierung sollte sich ein Induktionseffekt einstellen, so dass ein beteiligtes Monooxygenasegen stärker exprimiert wird und Transkripte in größerer Anzahl in der Zelle vorliegen. Zum Zeitpunkt der höchsten Produktbildung, nach drei bzw. vier Tagen Kulturdauer, wurde die Gesamt-RNA isoliert. Hieraus wurde anschließend mittels PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Clontech) die subtraktive cDNA synthetisiert (s. Kapitel 4.1.4).

5.1.3.2 Subtraktive cDNA-Synthese

Die Synthese subtraktiver cDNA ermöglichte es, zwei mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen und die mRNA bzw. cDNA differentiell exprimierter Gene anzureichern (Jin *et al.*, 1997). Die Qualität der hierzu benötigten mRNA aus induzierten und nicht induzierten Kulturen wurde im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel und zusätzlich kapillargelektrophoretisch kontrolliert. Die Stabilität von RNA ist wegen der ubiquitär vorliegenden RNase-Aktivitäten gefährdet (Farrell, 1996). Diese wurde zunächst in cDNA umgeschrieben, chromatographisch gereinigt und mit dem Restriktionsenzym Rsa I geschnitten, um geeignete Adapterligationsstellen zu generieren. Das folgende Schema zeigt detailliert die der Adapterligation folgenden subtraktiven Hybridisierungen (Abb. 5.5).

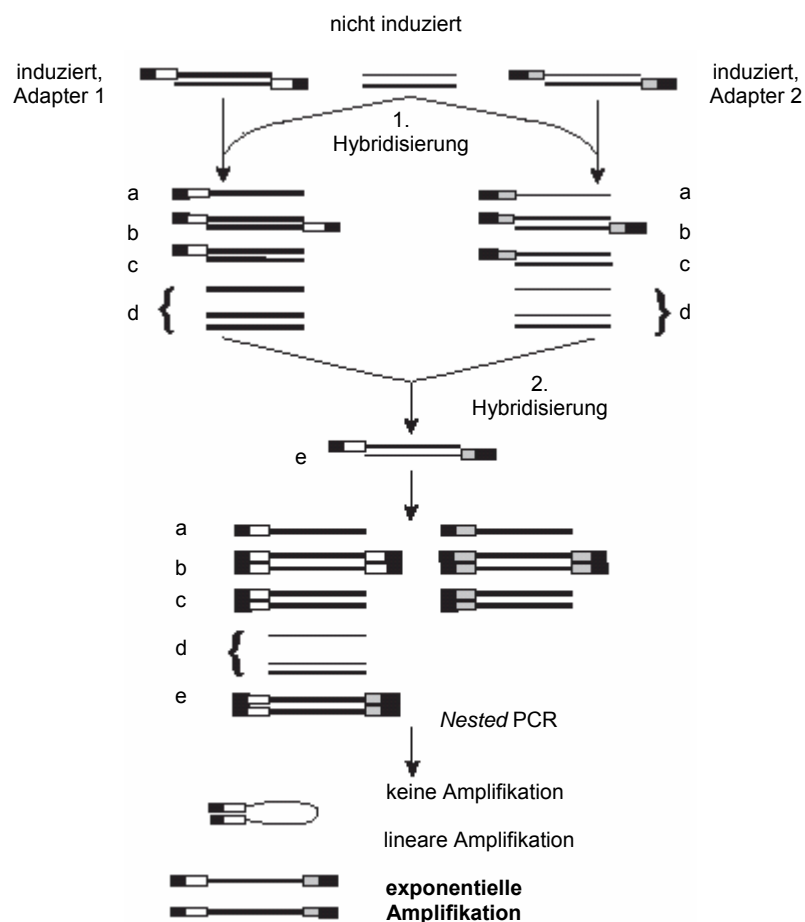


Abbildung 5.5: Subtraktive Hybridisierung. PCR-Select (BD Clontech)

Die geschnittene cDNA aus induzierter Kultur wurde geteilt und mit unterschiedlichen Adaptern (Adapter 1 und 2) ligiert. Diese cDNAs wurden mit cDNA aus nicht induzierter Kultur im Überschuss hybridisiert (1. Hybridisierung). Daraus entstanden nicht differentiell exprimierte cDNAs (Typ c) und subtraktive cDNAs (Typ a). Typ b stellt rehybridisierte cDNA aus induziertem Ansatz, Typ d überschüssige cDNA aus nicht induziertem Ansatz dar.

In einer zweiten Hybridisierung wurden beide Ansätze (induziert und nicht induziert) zusammengegeben und hybridisiert. Nur die cDNAs vom Typ e waren differentiell exprimiert und wurden aufgrund unterschiedlicher Adapter und der daraus resultierenden Primerverwendung exponentiell amplifiziert und somit angereichert. Produkte vom Typ c wurden linear amplifiziert und stellten einen unvermeidbaren Hintergrund aus nicht differentiell exprimierter cDNA dar. Typ b bildete die sogenannte „*pan-like*“-Struktur, es erfolgte wie bei Typ a ebenfalls keine Amplifikation. Bei dem Typ d handelte es sich um cDNA aus nicht induzierter Kultur. Die subtraktive cDNA wurde als Template für verschiedene Screeningmethoden eingesetzt.

5.1.4 Neue Cytochrom P450 Monooxygenasen aus *P. sapidus*

Für die Isolierung des Transkriptes eines bestimmten Gens wurden spezifische Sequenzinformationen benötigt. Die reverse Translation von Peptidsequenzdaten setzt die Isolierung des entsprechenden Proteins voraus. Die Reinigung von Cytochrom P450 Monooxygenasen aus Basidiomyceten ist aufgrund der Lokalisierung in mikrosomalen Zellmembranen und der damit verbundenen geringen Wasserlöslichkeit nur schwer möglich und wurde bisher noch nicht beschrieben.

Aufgrund fehlender Peptiddaten wurden *Primer* von Konsensussequenzen abgeleitet (s. Kapitel 4.1.5). Die wenigen bislang auf molekularer Ebene beschriebenen CyP450 Monooxygenasen aus Basidiomyceten besaßen trotz ihrer hohen strukturellen und funktionellen Diversität konservierte Sequenzabschnitte. Neben der Region der Membranbindung, einem Prolin-reichen Sequenzabschnitt und der Mäanderregion trat besonders die hochkonservierte Hämbindedomäne hervor, die allen gemein ist und sich zur Ableitung von Primern eignete (Akiyama *et al.*, 2002).

Aufgrund des degenerierten Codes der DNA-Informationen wurden bei der Primerableitung sogenannte „*Wobbels*“ verwendet. Mit den vier Basen der DNA lassen sich 64 verschiedene Triplets bilden. Da aber nur 21 codogene Aminosäuren

vorkommen, wird eine Aminosäure durch ein bis sechs Triplets codiert. Die Rückübersetzung der Sequenzinformation der Aminosäuren Arginin (R), Leucin (L) und Serin (S) bereitete dabei aufgrund der Verwendung von sechs verschiedenen Codons besondere Schwierigkeiten. Die Hämbinderegion FGFGRRICPG besaß zentral zwei Argininreste, so dass mehrere „*Wobbles*“ verwendet wurden. Da die Spezifität einer Primerbindung mit steigender Anzahl an „*Wobbles*“ sinkt, wurde eine Vielzahl an Primern konstruiert und im Screening eingesetzt.

Der konservierte Bereich der Hämbindestelle gestattete den Zugang zu neuartigen CyP450-Monooxygenasen auf molekularbiologischem Wege. Dieses Motiv ist jedoch so hoch konserviert, daß der Einsatz von hämbinderegionspezifischen Primern die Möglichkeit birgt, trotz Induktion mit α -Pinen die am stärksten exprimierte und nicht die der an dieser Biotransformation beteiligten P450-Transkripte zu isolieren. Bei einer großen Anzahl von Monooxygenasegenen wurden die meisten Transkripte durch stark exprimierte P450-Gene verdeckt.

Durch die Verwendung hämbinderegionspezifischer *Primer* wurden zwei neue Cytochrom P450 Monooxygenase cDNAs, CyP450_1 und CyP450_3, identifiziert und durch *Primer Walking* isoliert. Beide Sequenzen besaßen das Motiv der Hämbinderegion, was eine Zugehörigkeit zur P450 Familie bestätigte (Nelson *et al.*, 1993).

Die Zuordnung in eine bestehende CYP-Familie setzte eine minimale Homologie auf Aminosäureebene von 40% voraus (Nelson *et al.*, 1987). Die Monooxygenase CyP450_1 besaß eine maximale Homologie von 39% zur Le.cypfb (Q764D1) aus *Lentinula edodes* und stellt somit das erste Mitglied einer neuen Familie dar. Die Monooxygenase CyP450_3 war mit einer maximalen Homologie von nur 31% zu einer CyP450 Monooxygenase aus *Aspergillus nidulans* (Q5B9Q3) ebenso einer neuen Familie zuzuordnen. Beide Enzyme verfügten, was das Molekulargewicht und die Sequenzlänge angeht, über eine gewisse Ähnlichkeit, sind jedoch auf Aminosäuresequenzebene mit nur etwa 26% Homologie kaum miteinander vergleichbar.

5.1.4.1 Induktionsanalysen

Eine Reihe von bekannten Monooxygenasegenen wurde durch die Zugabe des Substrates induziert. So stieg die Expressionsrate der CyP450 Monooxygenase CYP52A2 aus *C. maltosa* durch Zugabe von Dodecen um den Faktor 100 (Seghezzi *et al.*, 1992). Auch eine Coregulationen von CyP450 Monooxygenase und CPR Reduktase ist beispielsweise für bphA aus *Aspergillus niger* bekannt. Eine Induktion bedeutete zugleich die verstärkte Expression der korrelierenden P450 Reduktase (van den Brink *et al.*, 1998). Andere Monooxygenasegene hingegen, wie die CYP512A1 aus *Coriolus versicolor*, wurden konstitutiv exprimiert (Ichinose *et al.*, 2002).

Durch Quantifizierung mittels Realtime-PCR können vergleichende Aussagen über die Transkriptionsrate von Genen und möglichen Induktionseffekten gemacht werden (Pfaffl, 2001). Dabei stehen zwei Quantifizierungsmöglichkeiten zur Auswahl. Die absolute Quantifizierung wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe definierter Templatemengen, beispielsweise synthetisierte DNA, durchgeführt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens auf einen internen Standard, ribosomale Untereinheiten oder andere „Haushaltsgene“ bezogen, so dass sich Unregelmäßigkeiten bei der Reversen Transkription und bei der Amplifikation, also der PCR-Effizienz, wieder aufheben. Diese Methode stellt die genauere Form dar und wurde hier angewendet (s. Kapitel 4.1.6).

Um Informationen über einen Induktionseffekt und somit eine Beteiligung der Monooxygenasen an der Oxidation von α -Pinen zu Verbenol zu bekommen, wurden mit genspezifischen Primern Fragmente der isolierten Sequenzen mittels Realtime-PCR amplifiziert. Relative quantifizierende Realtime-PCR-Analysen wurden bereits mit dem Transkript einer Glucoamylase aus *Aspergillus niger* durchgeführt (Jungebloud *et al.*, 2006). Als Template wurde cDNA aus induzierter und aus nicht induzierter Kultur von *P. sapidus* vergleichend eingesetzt. Der interne Standard der mitochondrialen V6-Domäne gewährleistet eine vergleichbare Qualität und Quantität der Transkripte in beiden cDNA-Banken und somit eine vergleichbare Effizienz der Reaktion. Die Transkriptionsrate dieser Sequenz wurde durch die Zugabe α -Pinen zur Submerskultur nicht beeinflusst.

Ein Induktionseffekt war durch die Zugabe von α -Pinen bei CyP450_3 nicht festzustellen. Das Transkript war in der nicht induzierten cDNA in größerem Maße

vorhanden. In der induzierten cDNA-Bank lag das Transkript der CyP450_1 Monooxygenase etwa 1,5fach höher vor als im nicht induzierten Ansatz, was auf einen schwachen Induktionseffekt schließen lässt. Es kam bei beiden Amplifikationen zu geringen Abweichungen durch die Bildung von Primer-Dimere, was das Fluoreszenzsignal ansteigen lässt und somit auch C_t -Werte beeinflussen kann. Zudem geht man bei der beschriebenen Berechnungsmethode von optimalen PCR-Bedingungen und einer Effizienz von 100% aus, was der Realität nicht entspricht. Zwischen den C_t -Werten der beiden Monooxygenasen bestand ein Unterschied von mindestens neun Zyklen. Ein Unterschied um einen Zyklus bedeutet unter optimalen Bedingungen eine Verdopplung der Transkriptanzahl in der Zelle. Das Gen der CyP450_1 wurde im Vergleich zur CyP450_3 deutlich stärker transkribiert. Da es sich bei dem Basidiomyceten *P. sapidus* um einen sogenannten Seitling handelt, der auf Laub- und Nadelholz wächst, ist dieser in seinem natürlichen Habitat von Terpenkohlenwasserstoffen, insbesondere α -Pinen, umgeben. Eine konstitutive Expression terpenoxidierender CyP450 Monooxygenasen ist daher denkbar.

5.1.4.2 Dreidimensionale Strukturen und Reaktionsmechanismus

Anhand der Gesamtsequenzdaten der beiden Monooxygenasen wurden dreidimensionale Proteinmodelle konstruiert (s. Kapitel 4.1.7). Bisher sind Kristallstrukturen von 148 CyP450 Monooxygenasen bekannt, wovon ein Großteil aus Säugetieren und ein kleinerer Teil aus Bakterien stammen (<http://swissmodel.expasy.org>). Als Template für beide 3D-Modelle wurde CYP152A1 (pdb ID: 1izo) aus *Bacillus subtilis* verwendet (Lee *et al.*, 2003). Daten kristallisierter Monooxygenasen aus Basidio- oder Ascomyceten sind nicht verfügbar. Trotz der geringen Sequenzhomologien zwischen CyP450 Monooxygenasen von oft unter 20%, ist ihnen eine ähnliche strukturelle Organisation gemein (Urlacher *et al.*, 2006). Die beiden Enzyme aus *P. sapidus* besaßen untereinander ebenfalls eine geringe Homologie (26%), jedoch mit einer ähnlichen Anzahl und Verteilung von Sekundärstrukturelementen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. Sie verfügten in ihrer Tertiärstruktur über eine typische CyP450-Faltung mit konservierter, zentraler Lokalisierung der Hämbinderegion. Das Substrat gelangt über einen spezifischen Tunnel zum aktiven Zentrum und wird dabei über hydrophobe Wechselwirkungen mit dort benachbarten, hydrophoben Aminosäureresten stabilisiert (Lee *et al.*, 2003; Wade *et al.*, 2004). Durch die

Bindung an das oxidierte Eisen(III)-Atom des Häms und die Aufnahme eines Elektrons wird dieses zu Eisen(II) reduziert, welches anschließend die Spaltung von molekularem Sauerstoff begünstigt. Ein Sauerstoffatom wird nach der Aufnahme eines weiteren Elektrons zu Wasser reduziert, das andere Sauerstoffatom wird auf das Substrat übertragen. Durch die Freisetzung des Produktes geht das Hämeisen wieder in den oxidierten Zustand über (Guengerich, 1999; Lewis, 1996).

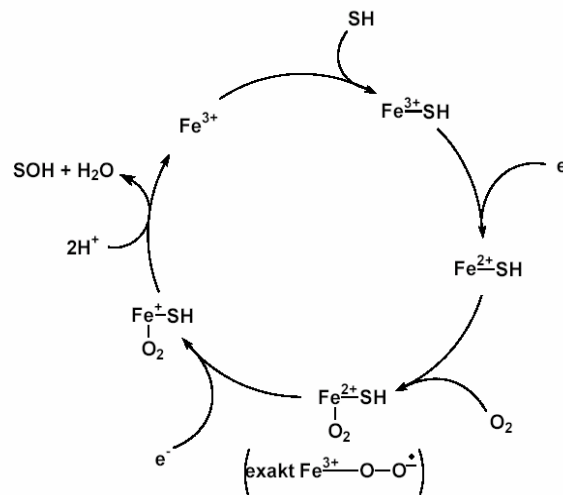


Abbildung 5.6: Zyklisch dargestellter Reaktionsmechanismus des Cytochrom P450 Monooxygenasesystems (Lewis, 1996)

5.1.5 Heterologe Expression und Biotransformationsversuche

Um hohe Proteinausbeuten für die Terpenoxidation zu erreichen, bietet sich die Expression in heterologen Wirten an. Inzwischen sind verschiedene Systeme kommerziell verfügbar, welche effektive Expressionen ermöglichen.

Das Bakterium *E. coli* bietet sich für eine Expression vorerst nicht an, da der korrekte Membraneinbau eukaryotischer Proteine in Prokaryoten bestimmte Chaperone voraussetzt, die bei *E. coli* fehlen. Polypeptide falten sich häufig schon während der Synthese am Ribosom ihre dreidimensionale Struktur, da die Information zur Faltung in der Aminosäuresequenz selbst festgelegt ist. Membranproteine werden jedoch unter Mitwirkung von Chaperonen und in Gegenwart der Membran korrekt gefaltet und dabei in diese eingebaut. Die codierten Aminosäureketten werden zwar im bakteriellen Cytoplasma synthetisiert, oft aber nicht in die exakte Tertiärstruktur überführt. Sie werden entweder abgebaut oder in sogenannten „*Inclusion bodies*“ in inaktiver Form angereichert. Für das Funktionieren eukaryotischer Proteine sind

zusätzlich oftmals separate posttranslationale Modifikationen wie Glykosidierung oder Phosphorylierung des Polypeptids erforderlich, wozu das bakterielle System ebenfalls nicht geeignet ist.

Daher wurden eukaryontische Expressionswirte wie *P. pastoris* gewählt, welche befähigt war, korrekte Proteinfaltungen und posttranslationale Modifikationen durchzuführen (Higgins und Cregg, 1998). Diese methylo trope Hefe ist molekularbiologisch erschlossen und es gibt eine Reihe von Beispielen für die Herstellung rekombinanter Proteine (Tab. 5.2).

Tabelle 5.2: Heterologe Produktion rekombinanter Proteine mit *P. pastoris*

Protein	Menge [g/L]	Expression	Referenz
Eosinophile Peroxidase, human	-	intrazellulär	Ciaccio <i>et al.</i> , 2006
Humanes CD38, Membranprotein	0,05	extrazellulär	Fryxell <i>et al.</i> , 1995
Interferon α 2b, human	0,4	intrazellulär	Garcia <i>et al.</i> , 1995
Laccase, <i>P. sajor-caju</i>	-	extrazellulär	Soden <i>et al.</i> , 2002
Serotonin Rezeptor, Maus	0,001	extrazellulär	Weiss <i>et al.</i> , 1995
Enterokinase	0,021	extrazellulär	Vozza <i>et al.</i> , 1996
Proteinase Inhibitor 6, human	0,05	intrazellulär	Sun <i>et al.</i> , 1995

Eine funktionelle Expression setzte ein Funktionieren von CyP450 Monooxygenasen mit endogener Reduktase aus *P. pastoris* voraus. Für die verwandte Hefe *S. cerevisiae* wurde eine funktionelle Expression einer CyP450 Monooxygenase *Le.CYP1* aus *Lentinula edodes* bereits beschrieben, wobei mit rekombinantem Enzym 7-Ethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin umgesetzt wurde (Akiyama *et al.*, 2004).

Nach der Umklonierung vom Klonierungsvektor pCR2.1 in den Expressionsvektor pPIC3.5K wurde dieser neue Vektor pPIC3.5KCyP450_1 linearisiert, mittels Elektroporation in *P. pastoris* transformiert und durch homologe Rekombination stabil ins Genom der Hefe integriert. Nach der Selektion geeigneter Klone wurden Submerskulturen inokuliert, mit Methanol induziert und nach einem Tag geerntet (s. Kapitel 4.1.9).

5.1.5.1 Solubilisierung

Da es sich bei CyP450 Monooxygenasen um mikrosomal gebundene Membranproteine mit hydrophoben Domänen handelt, die eine geringe Wasserlöslichkeit bedingen, wurden die Detergenzien 4-Octylbenzol-Amidosulfobetain (Obas) und Cholsäure zum Zellaufschluss zugesetzt. Obas eignet sich besonders gut für die Solubilisierung von integralen Membranproteinen (Henningsen *et al.*, 2002), während Cholsäure als Hauptbestandteil der Gallensäuren ebenfalls über polare und unpolare Regionen verfügt, somit zur Fettresorption beiträgt (Löffler und Petrides, 2003). Diese solubilisierten Zellextrakte wurden für den biochemischen Nachweis und in Biotransformationsversuchen eingesetzt.

5.1.5.2 Biochemischer Nachweis mittels polyklonaler Antikörper

Da die Ergebnisse der Realtime-PCR eine deutlich höhere Transkriptionsrate der cDNA der Monooxygenase CyP450_1 gegenüber der CyP450_3 zeigten, wurde diese Sequenz für weitere Experimente herangezogen (s. Kapitel 4.1.9). Vor den Expressionsuntersuchungen wurde die Insertion in Hefegenom durch Kolonie-PCR kontrolliert. Mit genspezifischen Primern wurde das Gen der Monooxygenase CyP450_1 in mehreren Klonen nachgewiesen.

Für den Nachweis des rekombinanten Proteins in *P. pastoris* wurden spezifische, polyklonale Antikörper gegen die Aminosäuresequenz CMLEAAPEDKPDNYE generiert. Anhand des dreidimensionalen Modells wurde diese an der Oberfläche des Enzyms CyP450_1 lokalisierte Domäne ausgesucht, so dass ein biochemischer Nachweis des rekombinanten Enzyms auch unter nativen Bedingungen stattfinden kann. Die Abbildung 4.19 zeigt den spezifischen immunologischen Nachweis der rekombinanten CyP450_1 in *P. pastoris*. Von mehreren hundert Klonen wurde der Klon Xcm1,45 identifiziert, der das Zielgen exprimiert. Das hier experimentell ermittelte Molekulargewicht von 51,5 kDa entsprach etwa der berechneten Größe von 57,5 kDa.

5.1.5.3 Biotransformationsversuche mit rekombinanter *P. pastoris*

Die zellfreien Extrakte des exprimierenden Klons Xcm1,45 wurden in Biotransformationsversuchen eingesetzt (s. Kapitel 4.1.10). Eine Aktivität bezüglich der Oxidation des Monoterpens α -Pinen wurde nicht gefunden.

Das rekombinante Protein wurde zwar nachgewiesen, die Transkription des Gens war belegt. Während der Translation kann es jedoch zu Fehlern bei der korrekten Faltung des Proteins kommen, so dass eine funktionelle Tertiärstrukturbildung ausbleibt. Auch ein fehlerhafter Einbau der katalytisch essentiellen Hämgruppe kann die fehlende Aktivität bedingen.

Bei der hohen Anzahl von verschiedenen CyP450 Monooxygenasen in Basidiomyceten mit mehr oder weniger breiten Substratspezifitäten ist die Wahrscheinlichkeit der richtigen Substratzuordnung gering. In einem CyP450 Aktivitätsassay wurden daher zusätzlich andere potentielle Substrate getestet und der Verbrauch des Cofaktors NADPH fotometrisch bei 340 nm erfasst. Einige bekannte CyP450-Substrate sind der Tabelle 4.8 zu entnehmen (s. Kapitel 4.1.10). Beispielsweise wurde Campher durch die bakterielle P450_{camr} an Position 5 und 6 hydroxyliert (Grogan *et al.*, 2002). Das bicyclische Monoterpenepoxid 1,8-Cineol wurde von *P. chrysosporium*, ebenso wie von der bakteriellen P450cin (CYP176A1) aus *Citrobacter braakii* an Position 2 und 3 hydroxyliert (Hawkes *et al.*, 2002). Cumarin hingegen wurde durch *P. chrysosporium* an vier Positionen hydroxyliert, wobei die Hydroxylierungen an den Positionen 3 und 7 durch andere CyP450 Monooxygenasen, CYP2A und P450 2A3 aus der Ratte, belegt sind (Honkakoski *et al.*, 1993; von Weymarn und Murphy, 2001). Zu weiteren typischen CyP450-Substraten zählen ebenso langkettige Fettsäuren wie Myristinsäure oder Laurinsäure (Lee *et al.*, 2003) und Steroide wie Progesteron (Mahato und Majumdar, 1993; Shkumatov *et al.*, 2005) und Ergosterol (Akiyama *et al.*, 2004). Die rekombinante CyP450 Monooxygenase PcCYP1f aus dem Basidiomyceten *P. chrysosporium* katalysierte die Hydroxylierung von Benzoesäure zu 4-Hydroxybenzoesäure. Das Enzym wurde in *P. pastoris* produziert und war nur in Gegenwart des Cofaktors NADPH und einer P450 Reduktase aus *P. chrysosporium*, ebenfalls aus rekombinanter Produktion, katalytisch aktiv (Matsuzaki und Wariishi, 2005).

Da bei der rekombinanten CyP450 aus *P. sapidus* keine Aktivität detektiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass in der Hefe keine mit der rekombinanten CyP450 Monooxygenase funktionierende Reduktase vorhanden war. Dabei ist davon auszugehen, dass Hefen über verschiedene P450 Reduktasen verfügen. Aus der nahen Verwandten *P. stipidis* sind fünf verschiedene CyP450 Monooxygenasen und eine P450 Reduktase (Jeffries *et al.*, 2007), aus *P. anomala* eine CyP450 Monooxygenase bekannt (Okhravi *et al.*, 1998). Da es sich um ein Zwei-Komponentensystem handelt, war eine funktionelle Expression der CyP450 Monooxygenasen vermutlich nur als Coexpression mit der entsprechenden P450 Reduktase aus *P. sapidus* möglich.

5.1.6 NADPH-abhängige P450 Reduktase (CPR)

Die NADPH-abhängige P450-Reduktase ist der Elektronendonator für verschiedene Oxygenasen, die im endoplasmatischen Retikulum der meisten eukaryontischen Zellen zu finden sind. CPR ist ein Flavoprotein, das sowohl FAD als auch FNM trägt. Die Elektronen werden vom Cofaktor NADPH über die prosthetischen Gruppen der Reduktase auf die CyP450 Monooxygenase übertragen. Die P450 Reduktase ist somit direkt an der Reaktion beteiligt (Hiratsuka *et al.*, 2001).

Die Bindedomänen der prosthetischen Gruppen, des Cofaktors und der CyP450 Monooxygenase sind hoch konserviert und eignen daher sich für die Ableitung verschiedener *Primer* (Ichinose *et al.*, 2002). Im PCR-Screening wurde basierend auf Größenvorhersagen ein Fragment identifiziert und die Gesamtsequenz anschließend durch *Primer Walking* isoliert (s. Kapitel 4.1.11). Der Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium* verfügt neben 150 CyP450 Monooxygenasen auch über mindestens fünf P450 Reduktasen (genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.home.html, Martinez *et al.*, 2004). Um Aussagen über eine Beteiligung an der Oxidation von α -Pinen und eine Interaktion mit der CyP450 Monooxygenase machen zu können, wurden ebenfalls Induktionsuntersuchungen mittels Realtime-PCR durchgeführt.

Im induzierten Ansatz war etwa zweimal soviel CPR_1-Template vorhanden wie im nichtinduzierten Vergleich, was einen Induktionseffekt durch α -Pinen bestätigt. Zudem wurde das Gen der CPR_1 im Vergleich mit der CyP450_3 deutlich stärker, verglichen mit der CyP450_1 jedoch ähnlich stark exprimiert. Fasst man die Ergebnisse der Realtime-PCR zusammen, so ist es sinnvoll, die cDNA der

CyP450_1 mit der CPR_1 in Kombinations- und Coexpressionsversuchen einzusetzen.

Anhand der dreidimensionalen Struktur kann die Funktionsweise des Enzyms nachvollzogen werden. Die modulartige Struktur des Proteins lässt vermuten, dass es ursprünglich aus kleineren Untereinheiten aufgebaut war (s. Kapitel 4.1.11.3). Als Template für die Berechnung des Modells wurde eine P450 Reduktase aus *S. cerevisiae* (pdb ID: 2BPO) verwendet. Zurzeit sind 16 dreidimensionale Strukturen kristallisierter P450 Reduktasen bekannt (<http://swissmodel.expasy.org>).

5.1.7 Expression in *S. cerevisiae*

Im Gegensatz zu *P. pastoris* wurde für *S. cerevisiae* bereits eine funktionelle Expression einer CyP450 Monooxygenase *Le.CYP1* aus dem Basidiomyceten *Lentinula edodes* mit einer endogenen Reduktase beschrieben (Akiyama *et al.*, 2004). Die Wahl des Wirtes *S. cerevisiae* ermöglichte zwei Optionen. Einerseits die funktionelle Expression mit einer endogenen Reduktase, andererseits eine Kombination von Zelllysaten Monooxygenase- und Reduktase-exprimierender Klone. Durch Klonierung entstanden die Vektoren pYES2.1CyP450_1, pYES2.1CyP450_3 (Abb. 4.1.26) sowie pYES2.1CPR_1 (s. Kapitel 4.1.12). Beide Möglichkeiten zeigten im Screening keine enzymatische Aktivität. Die Sequenzen beider Monooxygenasen besaßen zwar Homolgien zur *Le.CYP1* (CyP450_1: 34%; CyP450_3: <26%), doch waren diese sehr gering. Eine Interaktion mit einer endogenen Reduktase aus *S. cerevisiae*, wie bei *Le.CYP1*, war dadurch nicht zwangsläufig gewährleistet.

Bei der Kombination von Zelllysaten Monooxygenase- und Reduktase-exprimierender Klone waren beide Enzyme in unterschiedlichen Mikrosomen getrennt voneinander lokalisiert. Eine Interaktion konnte dadurch verhindert gewesen sein. Eine Möglichkeit, dieses zu umgehen, wäre die Coexpression in einem Klon, so dass sich ein funktionierendes rekombinantes Cytochrom P450 Monooxygenasesystem zusammensetzen kann.

5.1.7.1 Coexpression von CyP450 und CPR_1

Der TA-Expressionsvektor pYES2.1TOPO ist prinzipiell nicht für Coexpressionen konzipiert. Er verfügt über eine TA-Schnittstelle und nur sehr wenige weitere Restriktionsschnittstellen. Hinter der optionalen His-Tag-Sequenz befindet sich jedoch eine Xba I-Schnittstelle, die für die Klonierung der P450 Reduktase aus *P. sapidus* verwendet wurde (s. Kapitel 4.1.12.2). Dazu wurde die Gesamtsequenz der P450 Reduktase mit Gal1-Promotor, der vektoreigenen Ribosomenbindestelle und dem Transkriptionsterminationssignal amplifiziert und über herangesetzte Xba I-Schnittstellen in die Vektoren pYES2.1CyP450_1 und pYES2.1CyP450_3 eingefügt. Das Template für die Amplifikation stellte der bereits vorhandene Expressionsvektor pYES2.1CPR_1 dar. Die Konstrukte pYES2.1CyP_1CPR_1 und pYES2.1CyP_3CPR_1 wurden in *S. cerevisiae* transformiert. Mit plasmidtragenden Klonen wurden anschließend Biotransformationsexperimente durchgeführt.

5.1.7.2 Biotransformationsversuche mit coexprimierender *S. cerevisiae*

Nach der Selektion auf uracilfreien Platten wurde die cDNA der P450 Reduktase CPR_1 durch Kolonie-PCR in *Saccharomyces*-Kolonien nachgewiesen.

Die Hauptkulturen dieser Klone wurden nach Vorkultur mit Galactose induziert und nach 24stündiger Inkubation zellfreie Extrakte in Biotransformationsversuchen eingesetzt. Da bezüglich des α -Pinens und der im CyP450-Aktivitätsassay eingesetzten, weiteren Substrate keine enzymatische Aktivität detektiert wurde, können vielfältige Möglichkeiten als Begründung in Erwägung gezogen werden. Aufgrund der Klonierung beider Gene in einen Expressionsvektor sind für ein funktionierendes rekombinantes System alle genetischen Voraussetzungen erfüllt. Allerdings handelt es sich bei der eukaryotischen Proteinbiosynthese, insbesondere bei der Ausbildung des Translationsinitiationskomplexes, um ein sehr komplexes System (Knippers *et al.*, 1997). Setzt man eine funktionierende Transkription beider Gene voraus, so sind bei der Translation beider Fremdgene mehrere Regulationsmechanismen beteiligt. Für eine effiziente Verwendung des Startcodons sollte die Sequenzumgebung, die Kozak-Sequenz, nicht von dem Motiv CCRCCATGG abweichen (Kozak, 1987). Bei der Primerkonstruktion wurde vor der Klonierung der cDNAs in den Expressionsvektor hierbei darauf geachtet.

Vergleicht man hinsichtlich der Translation die *Codon usage* beider Organismen, so stellt man zwar Unterschiede zwischen *P. sapidus* und *S. cerevisiae* fest, jedoch würde dadurch eine Translation nicht verhindert (s. Kapitel 3.2.2.6 und kazusa.or.jp/codon/; Nakamura *et al.*, 2000).

Sofern beide Enzyme in der Tertiärstruktur mit korrekter Faltung vorliegen, muss bei einem komplexen Enzymsystem wie dem CyP450 Monooxygenasesystem eine Interaktion beider Komponenten, im Gegensatz zum natürlichen Fusionsprotein P450_{BM3} aus *Bacillus megaterium*, gewährleistet sein. Zudem spielt der Einbau der prosthetischen Gruppen, sowohl des FAD und FMN in die Reduktase, als auch der Hämgruppe in die Monooxygenase, zur Ausbildung eines rekombinanten Systems mit funktionierendem Elektronentransport eine entscheidende Rolle.

Geht man davon aus, dass *P. sapidus* wie der Basidiomycet *P. chrysosporium* ebenfalls über eine ähnlich hohe Anzahl von CyP450 Monooxygenasen und P450 Reduktasen verfügt, so ist ohne andere Hinweise als die schwachen, durch Realtime PCR festgestellten, Induktionseffekte eine Substrat-Enzym-Zuordnung schwierig.

Alle Faktoren bringen vielfältige Fehlerquellen mit sich, so dass eine rekombinante, funktionelle Coexpression beider Gene nicht ohne weiteres durchführbar ist. Eine heterologe Coexpression von CyP450 Monooxygenase und P450 Reduktase aus Pilzen ist in der Literatur bisher nicht bekannt.

5.2 Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* (Q5W281)

Extrazelluläre Lipasen aus Mikroorganismen, insbesondere aus *C. rugosa*, sind gut untersucht und besitzen aufgrund ihrer breiten Substratakzeptanz und der daraus resultierenden vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten eine hohe biotechnologische Bedeutung (Benjamin und Pandey, 1998). Auch in der modernen Lebensmitteltechnologie finden mikrobielle Lipasen in diversen Produkten und Herstellungsverfahren Anwendung.

Für die Verwendung von Carotinoiden als antioxidative Zusätze oder farbgebende Komponenten in der Futter- und Lebensmittelindustrie spielt die Bioverfügbarkeit eine entscheidende Rolle (Zorn, 2003). Pflanzliche Rohstoffquellen (z. B. *Tagetes erecta*, *Capsicum annum*) enthalten Xanthophylle fast ausschließlich mit Fettsäuren verestert als Mono- oder Diester (Breithaupt *et al.*, 2002).

Eine produktschonende und günstige Alternative zur herkömmlichen chemischen Verseifung stellt die enzymatische Hydrolyse dar, wobei bisher bekannte kommerzielle Lipasen eine nur sehr geringe Substratakzeptanz und geringe Umsatzraten zeigten (Breithaupt und Schwack, 2000). Die Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* hydrolysierte hingegen Xanthophyllester mit hoher Effektivität (Abb. 5.7; Zorn *et al.*, 2005a).

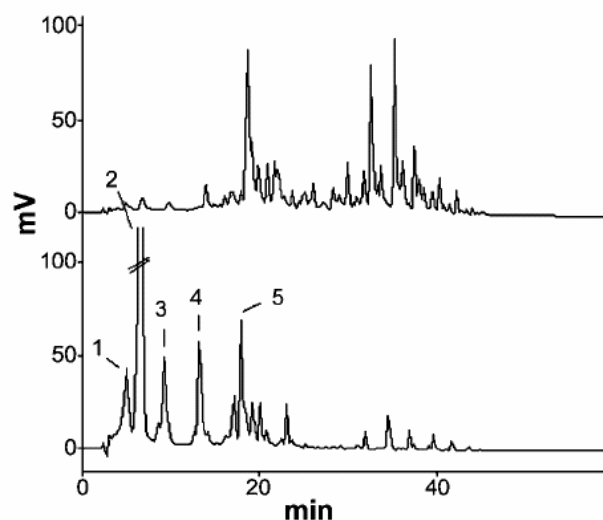


Abbildung 5.7: Xanthophyllesterhydrolyse mit isolierter Carboxylesterase aus *P. sapidus*. Hitzeinaktivierter Blindwert (oben), aktives Enzym (unten), 1 (Z)-Capsanthin; 2 all-(E)-Capsanthin; 3 Zeaxanthin; 4 b-Cryptoxanthin; 5 all-(E)-b-Carotin; HPLC-DAD Chromatogramm

Da es sich *P. sapidus* um den nahen Verwandten des Speisepilzes Austernseitling (*P. ostreatus*) handelt, sind toxikologische Risiken für lebensmittelbiotechnologische Applikationen zu vernachlässigen.

5.2.1 Proteinbiochemische Darstellung

Unter nativen Bedingungen wurde nach der Größenausschlusschromatographie (GPC) in den aktiven Fraktionen ein Molekulargewicht von etwa 430 kDa festgestellt. Unter denaturierenden Bedingungen zeigte das Monomer, welches durch ESI-MS/MS und Edman-Sequenzierung eindeutig als Lipase/Esterase identifiziert wurde, eine Größe von etwa 54,9 kDa, was auf ein aktives Octamer schließen lässt (Abb. 4.2.1). Oligomere Strukturen von Lipasen sind u. a. aus *C. rugosa* (Dimer) und *Phytium ultimum* (Tetramer) bekannt (Saxena *et al.*, 2003). Bei dieser Lipase aus *P. sapidus* handelt es sich offenbar um ein neuartiges Enzym mit bisher unbekanntem biochemischen Charakteristika.

Eine katalytische Aktivität des Monomers wurde in Hydrolyseversuchen mit ausgeschnittenen SDS-PAGE-Banden untersucht. Eine modifizierte SDS-PAGE mit verringertem SDS-Gehalt und ohne DTT-Zugabe sollte eine Denaturierung des Enzyms weitgehend verhindern. Eine Hydrolyse der Xanthophyllester unter Bildung von freien Xanthophyllen wurde unter diesen Bedingungen jedoch nicht festgestellt.

In anderen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde zur Isolierung des Enzyms die alternative Methode der Zerschäumung unter Verwendung des Emulgators Tween 80 angewendet (Linke *et al.*, 2005). Unter diesen SDS-freien Bedingungen war eine Aktivität der Xanthophyllesterase jedoch detektierbar. Geringe SDS-Konzentrationen bedingen bereits eine Denaturierung des Enzyms (s. Kapitel 4.2.2).

5.2.2 Isolierung der korrespondierenden cDNA

Anhand der ermittelten Peptiddaten und der Edman-Sequenz des N-Terminus, welche sich für die Ableitung degenerierter *Primer* eigneten, wurde die korrespondierende cDNA in einem ausführlichen PCR-Screening isoliert (s. Kapitel 4.2.4). Durch FASTA-Datenbankvergleiche wurde das Enzym eindeutig als Mitglied der Typ B Carboxylesterase/Lipase-Familie erkannt. Die ermittelten Peptidsequenzen wurden in der übersetzten Sequenz wiedergefunden. Durch den

Vergleich der Edman-Sequenz mit der übersetzten Aminosäuresequenz wurde ein Exportsignal von 22 Aminosäuren identifiziert.

Der Aminosäuresequenzvergleich mit der Lipase 2 aus *C. rugosa* zeigt die drei konservierten, katalytisch essentiellen Aminosäuren der katalytischen Triade, Serin, Glutamat und den katalytisch aktiven Histidinrest. Das Serin befindet sich in der hoch konservierten Region G-X-S-X-G (Hulo *et al.*, 2006), Glutamat und Histidin in anderen Konsensussequenzen des aktiven Zentrums. Nicht nur die Anordnung dieser Aminosäuren innerhalb der Aminosäuresequenz, sondern auch deren Orientierung in der dreidimensionalen Proteinstruktur ist charakteristisch und von essentieller Bedeutung (Malcata *et al.*, 1992). Die Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* gehört wie bisher alle in ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärten Lipasen dem charakteristischen 3D-Struktur-Typ der α/β -Hydrolase-Faltung an. Als Template für die Berechnung der 3D-Struktur wurde die Lipase 2 aus *C. rugosa* (pdb ID: 1gz7) verwendet (Guex und Peitsch, 1997).

Verschiedene Lipasen aus Basidiomyceten, aus *A. bisporus* (Holtz und Smith, 1978), *Bjerkandera adusta* (Gutierrez *et al.*, 2002), *P. sajor-caju* (Nair *et al.*, 1990) und aus *Tyromyces sambuceus* (Hädrich-Meyer und Berger, 1994) wurden bereits auf biochemischer Ebene charakterisiert. Jedoch stellt die Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* die erste auf molekularer Ebene beschriebene, vollständig sequenzierte und klonierte Lipasesequenz aus einem Basidiomyceten dar.

Manganperoxidasen hingegen benötigen zur Oxidation die Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen und H_2O_2 . Diese Enzyme oxidieren zunächst Mn^{2+} - zu Mn^{3+} -Ionen, welche daraufhin phenolische Substrate unspezifisch oxidieren. Weißfäulepilze sekretieren zumeist beide Typen von Peroxidasen als unterschiedliche Isoenzyme (Ruiz-Duenas *et al.*, 1999).

Polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii* besitzen neben höheren Homologien zu Ligninperoxidasen als zu Manganperoxidasen aus *P. chrysosporium* auch größere strukturelle Ähnlichkeiten zu diesem Typ. Sie verfügen jedoch auch über Manganbindestellen und sind in der Lage, Mn^{2+} zu oxidieren, sind aber im Gegensatz zu Manganperoxidasen hiervon bei der Oxidation unabhängig (Ruiz-Duenas *et al.*, 1999). Sie verbinden beide Reaktionstypen und sind, wie Manganperoxidasen, durch H_2O_2 -Zugabe induzierbar.

Da das natürliche Substrat Lignin ein komplexer, hochmolekularer Naturstoff ist, besitzen ligninolytische Enzyme zumeist ein unspezifisches Oxidationspotential, das auch in anderen Zusammenhängen genutzt werden kann. Durch die Spaltung von Carotinoiden beispielsweise werden geruchsintensive, norisoprenoide Verbindungen zugänglich. Eine hierzu befähigte Peroxidase (VPL3) wurde in vorangegangenen Arbeiten aus *P. eryngii* isoliert und auf molekularer Ebene beschrieben (Scheibner, 2006). Ebenso sind zwei weitere Isoenzyme (VPL1 und VPL2), die dieser Gruppe zuzuordnen sind, aus *P. eryngii* bekannt (Ruiz-Duenas *et al.*, 1999). Auch *P. pulmonarius* (Camarero *et al.*, 1996), *P. ostreatus* (Sarkar *et al.*, 1997) und *Bjerkandera adusta* (Heinfling *et al.*, 1998) besitzen diesen Typ Peroxidase. Die Expression eines analogen Gens im nahen Verwandten *P. sapidus* wurde untersucht und die cDNA mittels Koloniehybridisierung isoliert (s. Kapitel 4.3).

5.3.1 cDNA-Isolierung durch Koloniehybridisierung

Für das Ableiten einer DNA-Sondensequenz wurde ein Alignment der beiden polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii* erstellt. Da es sich hier um weitgehend homologe Isoenzyme handelt und diese über Manganbindestellen verfügen, wurde eine weitere Sequenz, die einer Manganperoxidase aus *P. ostreatus*, herangezogen. Aufgrund der Verwendung von degenerierten DNA-Sonden und hohen stringenten Bedingungen wurde ein Klon identifiziert, der eine Peroxidasesequenz im Klonierungsvektor trug. Durch Datenbankrecherchen (FASTA-Algorithmus) und Alignments mit Peroxidasen unterschiedlicher Gruppen wurde diese Sequenz als

polyvalente Peroxidase erkannt. Sie verfügt über eine Homologie von über 90% zu den Isoenzymen aus *P. eryngii*. Die Homologien zu anderen Peroxidasen sind deutlich geringer (71% zu MnP; 63% zu LiP).

Das Alignment zeigt die Sequenz der Peroxidase aus *P. sapidus* im Vergleich zu den beiden Sequenzen der polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii*. Neben der großen Homologie waren ebenfalls konservierte und katalytisch essentielle Aminosäurereste wie die Hämliganden (distales His67 und proximales His199) und typischerweise die Mn^{2+} -Bindestellen (Glu66, Glu70 und Asp205) wiederzufinden (s. Kapitel 4.3.1).

Der Vergleich von acht verschiedenen Peroxidasen (LiP, MnP und VP) zeigte die Verwandtschaftsbeziehung der Aminosäuresequenz in Form eines Phylogramms. Es gab deutlich nähere Verbindungen zu MnPs als zu LiPs, jedoch war die neue Sequenz eindeutig der Gruppe der polyvalenten Peroxidasen zuzuordnen (s. Kapitel 4.3.2).

Der Vergleich des dreidimensionalen Modells mit dem der polyvalenten Peroxidase aus *P. eryngii* verdeutlichte die typische, konservierte Tertiärstruktur. Als Template für die Berechnungen der Modelle wurde eine Häm-Peroxidase aus *Coprinopsis cinerea* (pdb ID: 1ly8) verwendet. Beide Enzyme verfügten über charakteristische Hämbindetaschen mit distalen und proximalen Liganden und über die benachbarte, konservierte Manganbindestelle (s. Kapitel 4.3.3).

Die drei Isoenzyme der Peroxidasen aus *P. eryngii*, die VPs aus *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* und aus *Bjerkandera adusta* bilden mit der neuen Sequenz aus *P. sapidus* die neue Gruppe der polyvalenten Peroxidasen (VP).

5.4 Laccasen aus *P. sapidus*

Laccasen (Phenoloxidasen) sind Oxidoreduktasen, die neben den Manganperoxidasen, den Ligninperoxidasen, den polyvalenten Peroxidasen und den H₂O₂-generierenden Oxidasen zur Gruppe der ligninolytischen Enzyme gezählt werden. Sie katalysieren durch vier Ein-Elektronen-Oxidationen von verschiedenen aromatischen Substraten zu Radikalkationen den unspezifischen oxidativen Ligninabbau, während Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Ducros *et al.*, 2001).

Laccasen sind extrazelluläre Glykoproteine, die von Basidiomyceten, Ascomyceten und Deuteromyceten sekretiert werden (Agematu *et al.*, 1993). In den meisten Fällen haben sie über einen Cystein- und zehn Histidinreste vier Cu-Ionen gebunden (Thursten, 1994). Höhere Pilze, insbesondere Basidiomyceten, verfügen über ein hohes ligninolytisches Potential und produzieren in vielen Fällen unterschiedliche Isoenzyme (Salas *et al.*, 1995). Diese sind durch verschiedene phenolische Verbindungen und Ligninpräparationen induzierbar (Leonowicz *et al.*, 2001).

Laccasen, vor allem aus *Trametes versicolor*, werden in der Papier- und Textilindustrie als Bleichmittel eingesetzt. Ihr oxidatives Potential zur Herstellung hochwertiger Lebensmittelinhaltsstoffe, wie Aromastoffe und Antioxidantien, wurde jedoch bisher kaum untersucht (Zorn, 2003). Laccasen aus *Trametes versicolor* und *Botrytis cinerea* katalysieren die Oxidation des Sesquiterpens Valencen zu dem Aromastoff Nootkaton, einer Schlüsselverbindung des Grapefruitaromas (Rongmin *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Beseitigung von phenolischen Komponenten aus Fruchtsäften (Alper und Acar, 2004).

Mittlerweile sind viele verschiedene Laccasen auch aus der Familie der *Pleurotaceae* bekannt (Linke *et al.*, 2005). Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei neue, bisher unbekannte Laccasen aus *P. sapidus* auf molekularbiologischer Ebene beschrieben (s. Kapitel 4.4).

5.4.1 Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung

Für die Produktion der Laccasen wurde der ligninhaltige, nachwachsende Rohstoff Erdnussschale als C-Quelle und gleichzeitiger Induktor verwendet. Bei der Produktion von Erdnüssen fallen diese als Nebenprodukte in nahezu uneingeschränkter Verfügbarkeit an (Linke *et al.*, 2005). Andere Induktionseffekte

durch Ferulasäure oder Veratrylalkohol sind ebenfalls bekannt (Soden und Dobson, 2001).

Anhand der durch entkoppelte 2D-Elektrophorese gereinigten Enzyme waren Peptidsequenzen und davon ausgehend cDNA-Sequenzen zugänglich. Basierend auf den Sequenzdaten tryptischer Peptide wurden degenerierte *Primer* entworfen (s. Kapitel 4.4.1). Die Peptide zeigten eine hohe Homologie zu einer Laccase aus *P. sajor-caju*, deren Gesamtsequenz und ein Alignment verschiedener Laccasen ebenfalls für die Ableitung herangezogen wurden. Beim Peptid 2 handelte es sich um den C-Terminus, so dass hiervon *Reverse-Primer* konstruiert wurden. Ein Edmanabbau war nicht möglich, da der N-Terminus durch N-Acetylamino-säuren oder glykosidierte Aminosäuren blockiert war.

Mittels PCR wurde ein 650 bp großes Fragment amplifiziert. Die Gesamtsequenz der Laccase 2 aus *P. sapidus* wurde durch *Primer Walking* isoliert. Sie besitzt eine Homologie von >90% zu Laccasen aus *P. pulmonarius* und *P. sajor-caju* (s. Kapitel 4.4.2).

Der Vergleich mit der Laccase 1 aus *P. sapidus* zeigte hingegen eine geringe Homologie von lediglich 46%, jedoch sind die konservierten Kupferionenbinderegionen in beiden Sequenzen vorhanden. Biochemisch sind sie sich hinsichtlich des Molekulargewichtes und der Sequenzlänge sehr ähnlich. Jedoch verfügte die Laccase 1 nur über eine N-Glykosidierungsstelle, während die Laccase 2 im Gegensatz dazu vier besaß, was auf ein anderes Glykosidierungsmuster schließen lässt. Es liegt nahe, dass es sich um zwei unterschiedliche Gruppen von Laccasen handelt, wie es bereits aus *Coprinopsis cinerea* bekannt ist (Hoegger *et al.*, 2004).

Trotz einer Sequenzhomologie von <45% besitzen beide Laccasen große strukturelle Ähnlichkeit (s. Kapitel 4.4.3). Sie bestehen aus drei Domänen mit vornehmlich antiparallelen β -Faltblattstrukturen, α -Helices sind jeweils nur drei vorhanden. Beiden gemein ist die zentrale Lokalisierung der konservierten Kupferionen-Bindestellen. Die 3D-Modelle wurden anhand von Röntgenstrukturdaten der Laccase LaclIb aus *Trametes versicolor* (pdb ID: 1KYA) berechnet. Zurzeit sind 19 dreidimensionale Strukturen kristallisierter Laccasen bekannt (<http://swissmodel.expasy.org>).

5.5 Ausblick

5.5.1 Das Cytochrom P450 Monooxygenase-System

Insgesamt wurden 11 Substrate unterschiedlicher Substanzgruppen getestet, jedoch kommen noch andere, potentielle Substrate für eine Umsetzung mit der coexprimierenden Hefe *S. cerevisiae* in Frage. Der etablierte CyP450-Aktivitätsassay kann für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Da es gelungen ist, eine P450 Reduktase aus dem Basidiomyceten *Coriolus versicolor* aktiv in *E. coli* zu exprimieren (Ichinose *et al.*, 2004), können des Weiteren ebenfalls andere, auch prokaryotische Wirte herangezogen werden.

Sofern die Enzyme CyP450_1 und CyP450_3 nicht mit der Oxidation von α -Pinen in Verbindung stehen, bietet der Basidiomycet *P. sapidus* ein großes Potential als Quelle weiterer CyP450 Monooxygenasen. Als Vorlage zur Isolierung weiterer cDNA-Sequenzen könnte das in Kürze veröffentlichte Genom des nahen Verwandten *P. ostreatus* verwendet werden.

Die Identifizierung der an der Oxidation von α -Pinen beteiligten CyP450 Monooxygenase setzt die Isolierung des entsprechenden Enzyms voraus. Durch Peptiddaten des isolierten Proteins wäre eine Zuordnung von Sequenz bzw. Enzym und katalytischer Aktivität bzw. Substrat möglich.

Bei erfolgreicher Expression können gezielt durch PCR-Mutagenese oder zufällig durch „gene shuffling“ (Cramer *et al.*, 1998) oder „in vitro“ gerichtete Evolution (Lentz *et al.*, 2001) Sequenzmodifikationen am Substratzugangstunnel und/oder im katalytischen Zentrum zur Verbesserung von Substratakzeptanz und Umsatzraten eingeführt werden. Mit diesen Methoden ist es ebenso möglich, ein künstliches Fusionsprotein nach dem natürlichen Vorbild der P450_{BM3} Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* zu entwerfen.

5.5.2 Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*

In Tagetes- und Paprikaextrakten liegt Capsanthin als Hauptxanthophyll überwiegend verestert vor. Capsanthin ist ein „allgemein zugelassener Zusatzstoff“, der als färbende Komponente in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie Verwendung findet, wobei jedoch freie Carotinoide bevorzugt werden. Eine günstigere, produkt- und umweltschonendere Alternative zur chemischen Verseifung

stellt die biotechnologische Hydrolyse dar. Voraussetzung hierfür ist die funktionelle Überexpression der cDNA der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* in heterologe eukaryotischen Wirten (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*) zur Herstellung großer Enzymmengen.

Aus *P. sapidus* ist eine zweite Lipase aus biochemischen Arbeiten bekannt. Peptidsequenzdaten für dieses Enzym wurden bereits ermittelt (Linke *et al.*, 2006). Durch ein PCR-Screening kann die cDNA-Gesamtsequenz ebenfalls isoliert und beide Enzyme auf molekularer Ebene miteinander verglichen werden.

5.5.3 Polyvalente Peroxidase aus *P. sapidus*

Die polyvalente Peroxidase besitzt, wie die Enzyme VP1, VP2 und VP3 aus dem nahen Verwandten *P. eryngii*, ein hohes Oxidationspotential. Um dieses mit einem Substratscreening näher untersuchen zu können, muss dieses Enzym in aktiver Form zur Verfügung stehen.

Eine heterologe Expression in einem geeigneten Wirt ermöglicht die Produktion dieses neuartigen Enzyms in größeren Mengen. Diverse Expressionen von Peroxidasen aus Pilzen in heterologen Wirten wurden bereits durchgeführt. Ein Beispiel hierfür ist die Peroxidase MnPL3 aus *P. eryngii*, welche aktiv in *A. niger* produziert wurde (Ruiz-Duenas *et al.*, 1999). Weitere Lignin- und Manganperoxidasen aus *Phanerochaete chrysosporium* wurden ebenfalls heterolog in *E. coli*, *Baculovirus*, *S. cerevisiae* und *A. niger* funktionell exprimiert (Conesa *et al.*, 2002).

5.5.4 Laccasen aus *P. sapidus*

Laccasen katalysieren ebenso wie Peroxidasen den oxidativen Ligninabbau. Der Aufschluss der Hemicellulose und des Lignins ermöglicht den Zugang zu wirtschaftlich interessanten Bestandteilen wie Glucose, Pentosen und substituierten Aromaten. Eine effektive heterologe Expression dieser Gene kann die Voraussetzung zur Herstellung großer Enzymmengen für die beschriebenen, biotechnologischen Applikationen schaffen. Die Produktion einer Laccase im heterologen Wirt *P. pastoris* wurde bereits beschrieben (Soden und Dobson, 2002).

6. Literaturverzeichnis

1. Agematu H, Shibamoto N, Nishida H, Okamoto R, Shin T, Murao S (1993) Oxidative decarboxylation of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl)glycine by Laccase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1877-1881
2. Alberts B *et al.* (2005) *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
3. Alper N, Acar J (2004) Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung* 48 :184-187
4. Andres DA *et al.* (1993) cDNA Cloning of Component A of Rab Geranylgeranyl Transferase and Demonstration of Its Role as a Rab Escort Protein. *Cell* 73:1091-1099
5. Akiyama R, Kajiwara S, Shishido K (2004) Catalytic Reaction of Basidiomycete *Lentinula edodes* Cytochrome P450, *Le.CYP1* Enzyme Produced in Yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:79-84
6. Akiyama R, Sato Y, Kajiwara S, Shishido K (2002) Cloning and Expression of Cytochrome P450 Genes, Belonging to a New Family, of the Basidiomycete *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:2183-2188
7. Asada Y, Watanabe A, Irie T, Nakayama T, Kuwahara M (1995) Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1251(2):205-209
8. Ausubel *et al.* (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York

9. Barnes WM (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci* 91:2216–2220
10. Bell SG, Chen X, Sowden RJ, Xu F, Williams JN, Wong LL, Rao Z (2003) Molecular Recognition in (+)- α -Pinene Oxidation by Cytochrome P450_{cam}. *J Am Chem Soc* 125: 705-714
11. Benjamin S, Pandey A (1998) *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14(12):1069-1087
12. Berger RG, Zorn H (2004) Flavors and Fragrances. In Tkacz JS, Lange L (Hrsg). *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York S. 341-358
13. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
14. Blum H, Beier H, Gross HJ (1988) Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99
15. Borson ND, Sato WL, Drewes LR (1992) A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods & Appl* 2:144–148
16. Breithaupt DE, Wirt U, Bamedi A (2002) Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 50(1):66-70
17. Breithaupt DE, Schwack W (2000) Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum*) by LC/MS. *Eur Food Res Technol* 211:52-55
18. Buchholz K, Kasche V (1997) *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. 1. Auflage, VCH Verlag, Weinheim

19. Camarero S, Ruiz-Duenas FJ, Sarkar S, Martinez MJ, Martinez T (2000) The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. FEMS Microbiology Letters 191: 37-43
20. Cao W, Epstein C, Liu H, DeLoughery C, Ge N, Lin J, Diao R, Cao H, Long F, Zhang X, Chen Y, Busche S, Wenck M, Wong K, Saltzman AG, Tang Z, Liu L, Zilberstein A (2004) Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-Select cDNA subtraction: a case study. BMC Genomics 5(1):26-32
21. Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. 24(1):45-66
22. Ciaccio C, Gambacurta A, De Sanctis G, Spagnolo D, Sakarikou C, Petrella G, Coletta M. (2006) rhEPO (recombinant human eosinophil peroxidase): expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization. Biochem J 395(2):295-301
23. Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CA (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. J Biotechnol 93(2):143-58
24. Cramer *et al.* (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Nature 391:288-298
25. Cregg JM, Higgins DR (1995) Production of Foreign Proteins in the Yeast *Pichia pastoris*. Canadian J Botany Supp 73:5981-5887
26. De Groot PWJ, Schaap PJ, van Griensven LJJ, Visser J (1997) Isolation of developmentally regulated genes from the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Microbiology 143:1993-2001

27. Diatchenko L, Chenchik A, Siebert P (1998) Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A⁺) or total RNA. In: Siebert P, Larrick J (Hrsg). RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis. BioTechniques Books S. 213-239
28. Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Østergaard P, Schneider P, Svendsen AG, Davies J (2001) Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Cryst* 57:333-336
29. Eastwood DC, Kingsnorth CS, Jones H, Burton KS (2001) Genes with increased transcript levels following harvest of the sporophores of *Agaricus bisporus* have multiple physiological roles. *Mycol Res* 105(10):1223-1230
30. Fahrendorf T, Dixon RA (1993) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa*). Molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* 305:509-515
31. Farrell RE (2005) RNA Methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 3. Auflage. Academic Press
32. Fryxell KB, O'Donoghue K, Graeff RM, Lee HC, Branton WD (1995) Functional Expression of Soluble Forms of Human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 6:329-336
33. Garcia JN *et al.* (1995) High Level Expression of Human IFN- α 2b in *Pichia pastoris*. *Biotechnologia Aplicada* 12:152-155
34. Gonzalez P, Labarere J (2000) Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology* 146(1):209-221

35. Gonzalez P, Labarère J (1998) Sequence and Secondary Structure of the Mitochondrial Small-Subunit rRNA V4, V6, and V9 Domains Reveal Highly Species-Specific Variations within the Genus *Agrocybe*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(11):4149-4160
36. Grogan G, Roberts GA, Parsons S, Turner NJ, Flitsch SL (2002) P450_{camr}, a cytochrome P450 catalysing the stereospecific 6-endo-hydroxylation of (1R)-(+)-camphor. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:449-454
37. Guengerich FP (1999) Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:1-17
38. Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18:2714-2723
39. Gutierrez A, del Rio JC, Martinez-Inigo MJ, Martinez MJ, Martinez AT (2002) Production of new unsaturated lipids during wood decay by lignolytic basidiomycetes. *Appl Environ Microbiol* 68:1344-1350
40. Hädrich-Meyer S, Berger RG (1994) Localization of lipolytic and esterolytic activities in *Tyromyces sambuceus*, a 4-decanolide-producing basidiomycete. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:210–214
41. Hardebusch B (2006) Terpenbiotransformation durch Enzyme aus Basidio- und Ascomyceten. Dissertation Universität Hannover
42. Hawkes DB, Adams GW, Burlingame AL, Ortiz de Montellano PR, De Voss JJ (2002) Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J Biol Chem* 277:27725-27732
43. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994

44. Heiden S, Erb R (2003) Transkript Biotechnologienachrichtenmagazin. Sonderheft Nachhaltige Biokatalyse, Deutsche Stiftung Umwelt
45. Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Bergbauer M, Szewzyk U. (1998) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. FEMS Microbiol Lett 165(1):43-50
46. Henningsen R, Gale BL, Straub KM, DeNagel DC (2002) Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics 2:1479-1488
47. Higgins DR, Cregg JM (1998) *Pichia* Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, New Jersey
48. Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673-4680
49. Hirano T, Sato T, Enei H (2004) Isolation of genes specifically expressed in the fruit body of edible basidiomycete *Lentinula edodes*. Biosci Biotechnol Biochem 68(2):468-472
50. Hiratsuka N, Oyadomari M, Shinohara H, Tanaka H, Wariishi H (2005) Metabolic mechanisms involved in hydroxylation reactions of diphenyl compounds by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem Eng J 23:241-246
51. Hoegger PJ, Navarro-Gonzales M, Kilaru S, Hoffmann M, Westbrook ED, Kues U (2004) The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). Curr Genet 45:9-18

52. Holtz RB, Smith DE (1978) Lipid metabolism of mushroom mycelia. *Mushroom Sci* 10:437–444
53. Honkakoski P, Maenpaa J, Leikola J, Pasanen M, Juvonen R, Lang MA, Pelkonen O, Raunio H (1993) Cytochrome P450A2-mediated coumarin 7-hydroxylation and testosterone hydroxylation in mouse and rat lung. *Pharmacol Toxicol* 72:107-112
54. Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Pagni M, Sigrist CJA (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 34:227-230
55. Ichinose H, Wariishi H, Tanaka H (2002) Identification and characterization of novel cytochrome P450 genes from the white-rot basidiomycete, *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58(1):97-105
56. Ichinose H, Wariishi H, Tanaka H (2004) Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(6):658-664
57. Irie T, Honda Y, Ha HC, Watanabe T, Kuwahara M (2000) Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *J Wood Sci* 41:230-233
58. Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, Schmutz J, Lindquist E, Dehal P, Shapiro H, Jin YS, Passoth V, Richardson PM (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol* 25(3):319-326
59. Jin H, Cheng X, Diatchenko L, Siebert PD, Huang CC (1997) Differential screening of a subtracted cDNA library: a method to search for genes preferentially expressed in multiple tissues. *Biotechniques* 23(6):1084-6

60. Jungebloud A, Bohle K, Göcke Y, Cordes C, Horn H, Hempel DC (2007) Quantification of product-specific gene expression in biopellets of *Aspergillus niger* with real-time PCR. *Enzyme and Microbial Technology* 40:653-660
61. Kawaguchi Y, Honda H, Taniguchi-Morimura J, Iwasaki S (1989) The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature* 341(6238):164-166
62. Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW (1997) The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5:173-185
63. Kirk TK, Schultz E, Connors WJ (1978) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol* 117:277-285
64. Knippers R, Phillipson P, Schäfer KP, Fanning E (1990) *Molekulare Genetik*, 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart/New York
65. Kozak, M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 messengers RNAs. *Nucl Acids Res* 15:8125-8148
66. Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage *T4*. *Nature* 227:680-685
67. Lang DA, Mannesse ML, de Haas GH, Verheij HM, Dijkstra BW (1998) Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem* 254:333-340
68. Larrondo LF, Canessa P, Vicuna R, Stewart P, Wymelenberg AV, Cullen D (2007) Structure and transcriptional impact of divergent repetitive elements inserted within *Phanerochaete chrysosporium* strain RP-78 genes. *Mol Genet Genomics* 277(1):43-55

69. Lee DS, Yamada A, Sugimoto H, Matsunaga I, Ogura H, Ichihara K, Adachi S, Park SY, Shiro Y (2003) Substrate Recognition and Molecular Mechanism of Fatty Acid Hydroxylation by Cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*. Crystallographic, Spectroscopic and Mutational Studies. *J Biol Chem* 278:9761-9767
70. Lentz O (2004) Klonierung, Expression und Charakterisierung der Cytochrom P450-Monooxygenase CYP102A3 aus *Bacillus subtilis* sowie Veränderung ihrer Regioselektivität durch gerichtete Evolution. Dissertation Universität Stuttgart
71. Lentz O, Li QS, Schwaneberg U, Lutz-Wahl S, Fischer P, Schmid RD (2001) Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450 BM-3 from *Bacillus megaterium* by directed evolution: a validated assay. *J Mol Catal B Enzym* 15:123-133
72. Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* 41(3-4):185-227
73. Lewis DFV (1996) Cytochrome P450: Structure, Function and Mechanism. Taylor & Francis, London
74. Linke D, Bouws H, Peters T, Nimitz M, Berger RG, Zorn H (2005) Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterisation and cloning. *J Agric Food Chem* 53:9498-9505
75. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25(4):402-8
76. Longhi S, Fusetti F, Grandori R, Lotti M, Vanoni M, Alberghina L (1992) Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta* 1131(2):227-232

77. Lotti M, Grandori R, Fusetti F, Longhi S, Brocca S, Tramontano A, Alberghina L (1993) Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene* 124(1):45-55
78. Löffler G, Petrides PE (2003) *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer, Berlin
79. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
80. Lutz-Wahl S (1999) Selektive Hydroxylierung von alpha und beta-Ionon durch *Streptomyces* Stämme und molekulargenetische Arbeiten zur Identifizierung und Isolierung der Ionon-Hydroxylase aus *Streptomyces fradiae*. Dissertation Universität Stuttgart
81. Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438(7071):1157-1161
82. Mahato SB, Majumdar I (1993) Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry* 34:883-898
83. Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG, Amundson CH (1992) Kinetics and mechanism of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 14:426-446
84. Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol* 22(6):695-700
85. Martinez AT (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and microbial technol* 30:425-444

86. Matsuzaki F, Wariishi H (2005) Molecular characterization of cytochrome P450 catalyzing hydroxylation of benzoates from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 334(4):1184-1190
87. Matsuzaki F, Wariishi H (2004) Functional diversity of cytochrome P450s of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 324(1):387-393
88. Moore RN, Golumbic C, Fisher GS (1956) Autoxidation of α -pinene. *J Amer Chem Soc* 78:1173-1176
89. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-962
90. Muraguchi H, Kamada T (2000) A mutation in the *eln2* gene encoding a cytochrome P450 of *Coprinus cinereus* affects mushroom morphogenesis. *Fungal Genet Biol* 29(1):49-59
91. Nair NG, Holley MP, Song CH, Cho KY (1990) Lipid metabolism of *Pleurotus sajor-caju*. *Ann Appl Biol* 116:455-462
92. Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T (2000) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucl Acids Res* 28:292
93. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12:1-51

94. Nelson DR, Strobel HW (1987) Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol Biol Evol* 4:572–593
95. Noble MEM, Cleasby A, Johnson LN, Egmond MR, Frenken LGJ (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* 331:123-128
96. Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31(13):3635-41
97. Ohloff G (1994) Scent and fragrances. Springer, Berlin
98. Ong E, Pollock WB, Smith M (1997) Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene* 196(1-2):113-119
99. Okhravi N, Adamson P, Mant R, Matheson MM, Midgley G, Towler HM, Lightman S (1998) Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism mediated detection and speciation of *Candida* spp causing intraocular infection *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(6):859-866
100. Pearson WR (1990) Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* 183:63-98
101. Perry CR, Smith M, Britnell CH, Wood DA, Thurston CF (1993) Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol* 6:1209-1218
102. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):45

103. Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (Hrsg). Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications, S. 21-34 Springer Press, Heidelberg
104. Reiser J, Walther IS, Fraefel C, Fiechter A (1993) Methods to investigate the expression of lignin peroxidase genes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol 59(9):2897-2903
105. Rongmin H, Christenson PA, Labuda IM (2000) Method for producing natural flavor by laccase. European Patent Application EP 00117432.5
106. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132:365-86
107. Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT (1999a) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Mol Microbiol 31(1):223-235
108. Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT (1999b) Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn(2+) and different aromatic substrates. Appl Environ Microbiol 65(10):4705-4707
109. Salas C, Lobos S, Larrain J, Salas L, Cullen D, Vicuna R (1995) Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnol Appl Biochem 21(3):323-33
110. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning, A Laboratory Manual. Band 3, Cold Spring Harbour Laboratory Press
111. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology 1992(24):104-108

112. Sarkar S, Martinez AT, Martinez MJ (1997) Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim Biophys Acta* 1339(1):23-30
113. Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods* 52:1-18
114. Scheibner M (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzymaktivitäten in Basidiomyceten. Dissertation Universität Hannover
115. Schomburg I, Chang A, Schomburg D (2002) BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res* 30:47-49
116. Schimpf G *et al.* (2002) *Gentechnische Methoden*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin
117. Schwede T, Kopp J, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31:3381-3385
118. Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K (1994) Rapid selection using G418 of high copy numbers transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology* 12:181-184
119. Seghezzi W, Meili C, Ruffiner R, Künzi R, Sanglard D, Fiechter A (1992) Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family cyp52 of *Candida tropicalis*. *DNA Cell Biol* 11:767-780
120. Shkumatov VM, Frolova NS, Rudaya EV, Faletrov YV, Mauersberger S, Barth G (2006) Range of Substrates and Steroid Bioconversion Reactions Performed by Recombinant Microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* Expressing Cytochrome P450c17. *Appl Biochem Micobiol* 42:472-478

121. Shuman S (1994) Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. *J Biol Chem* 269:32678-32684
122. Soden DM, Dobson AD (2001) Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147(7):1755-1763
123. Soden DM, O'Callaghan J, Dobson AD (2002) Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* 148(12):4003-4014
124. Sprecher E, Hanssen HP (1982) Influence of Strain Specificity and Culture Conditions on Terpene Production by Fungi. *Planta Med* 44:41-43
125. Sun J, Coughlin P, Salem HH, Bird P (1995) Production and Characterization of Recombinant Human Proteinase Inhibitor 6 Expressed in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys ACTA* 1252:28-34
126. Syldatk C, Hauer B, May O (2001) Biokatalyse in der chemischen Industrie. *BIOspektrum* 2:145-147
127. Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26
128. Urlacher VB, Eiben S (2006) Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* 24(7):324-30
129. van den Brink HM, van Gorcom RF, van den Hondel CA, Punt PJ (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol* 23(1):1-17
130. van der Werf MJ, de Bont JAM, Leak DJ (1997) Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 55:147-177
131. von Weymarn LB, Murphy SE (2001) Coumarin metabolism by rat esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3. *Chem Res Toxicol* 14:1386-1392

132. Vozza LA *et al.* (1996) Production of a Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 14:77-81
133. Wade RC, Winn PJ, Schlichting I, Sudarko (2004) A survey of active site access channels in cytochromes P450. *J Inorg Biochem* 98(7):1175-82
134. Wakamiya T, Saruta K, Yasuoka J, Kusumoto S (1994) An efficient procedure for solid-phase synthesis of phosphopeptides by the Fmoc strategy. *Chem Lett* 1099-1102
135. Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BS, Kim JJ (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 94(16):8411-8416
136. Wang Y, Geer LY, Chappay C, Kans JA, Bryant SH (2000) Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem Sci* 25(6):300-302
137. Weiss HM, Haase W, Michel H, Reilander H (1995) Expression of Functional Mouse 5-HT_{5A} Serotonin Receptor in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*: Pharmacological Characterization and Localization. *FEBS* 377:451-456
138. Yadav JS, Doddapaneni H, Subramanian V (2006) P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. *Biochem Soc Trans* 34(6):1165-1169
139. Yadav JS, Loper JC (2000) Cytochrome P450 oxidoreductase gene and its differentially terminated cDNAs from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr Genet* 37(1):65-73
140. Yue ST, Johnson ID, Huang Z, Haugland RP (1994) Unsymmetrical cyanine dyes with a cationic side chain. Patent 05321130, USA

141. Zorn (2003) Biochemische und molekularbiologische Strategien zur Synthese von Aromastoffen. Habilitationsschrift Universität Hannover
142. Zorn H, Bouws H, Takenberg M, Nimtz M, Getzlaff R, Breithaupt D, Berger RG (2005a) An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. *Biol Chem* 386:435-440
143. Zorn H, Breithaupt DE, Takenberg M, Schwack W, Berger RG (2003) Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme Microb Technol* 32(5):623-628
144. Zorn H, Peters T, Nimtz M, Berger RG (2005b) The Secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* 5:4832-4838

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1: Fruchtkörper des Basidiomyceten *P. sapidus*
- Abbildung 3.1: Klonierungsvektor pCR2.1
- Abbildung 3.2: Expressionsvektor pPIC3.5K für *P. pastoris*
- Abbildung 3.3: Expressionsvektor pYES2.1/V5-His für *S. cerevisiae*
- Abbildung 3.4: Verwendete DNA-Marker
- Abbildung 3.5: Verwendeter Proteinmarker für die SDS-PAGE
- Abbildung 3.6: Der Basidiomycet *P. sapidus*
- Abbildung 3.7: Kulturführung von *P. sapidus* für die Herstellung subtraktiver cDNA
- Abbildung 3.8: Reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA-Bank (BD Clontech)
- Abbildung 3.9: Subtraktive cDNA-Synthese, PCR-Select (BD Clontech)
- Abbildung 3.10: RNA 6000 LabChip® (Agilent)
- Abbildung 3.11: Prinzip des *Primer Walking*
- Abbildung 3.12: Das TA-Klonierungsprinzip (Invitrogen)
- Abbildung 4.1: DNA-Sequenz der V6-Domäne des mitochondrialen rRNA-Gens
- Abbildung 4.2: Biotransformation von α -Pinen in Submerskultur von *P. sapidus*
- Abbildung 4.3: Gesamt-RNA aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.4: Rsa I-Verdau der Gesamt-cDNA aus induzierter Kultur
- Abbildung 4.5: Subtraktive cDNA aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.6: Subtraktive cDNA
- Abbildung 4.7: Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener CyP450 Monooxygenasen aus Basidiomyceten
- Abbildung 4.8: PCR-Screening zur Amplifikation CyP450-spezifischer Fragmente
- Abbildung 4.9: DNA- und übersetzte Aminosäuresequenz der Monooxygenase CyP450_1 aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.10: DNA- und übersetzte Aminosäuresequenz der Monooxygenase CyP450_3

- Abbildung 4.11: Alignment der Aminosäuresequenzen der CyP450_1 und CyP450_3
- Abbildung 4.12: Amplifikationskurven der CyP450_1- und CyP450_3-Fragmente
- Abbildung 4.13: Schmelzkurven der PCR-Produkte V6, CyP450_1 (CyP_1) und CyP450_3 (CyP_3)
- Abbildung 4.14: 3D-Modell der Monooxygenase CyP450_1
- Abbildung 4.15: 3D-Modell der CyP450_3
- Abbildung 4.16: Auftrennung der Klonierungselemente im Agarosegel
- Abbildung 4.17: Vektor pPIC3.5KCyP450_1 für die Expression der Monooxygenase CyP450_1 in *P. pastoris*
- Abbildung 4.18: Nachweis der Insertion der cDNA der CyP450_1 ins Genom von *P. pastoris*
- Abbildung 4.19: SDS-PAGE (links) und Western *Blot* (rechts) der rekombinanten CyP450_1
- Abbildung 4.20: Ausschnitt eines Alignments der Aminosäuresequenzen von P450-Reduktasen
- Abbildung 4.21: PCR-Screening zur Isolierung der cDNA einer P450 Reduktase
- Abbildung 4.22: DNA- und übersetzte Aminosäuresequenz der P450 Reduktase (CPR_1) aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.23: Amplifikationskurven der PCR-Produkte der CPR_1 und V6
- Abbildung 4.24: Schmelzkurven der PCR-Produkte CPR_1 und V6
- Abbildung 4.25: 3D-Modelle der P450 Reduktase CPR_1
- Abbildung 4.26: DNA-Konstrukte pYES2.1CyP450_1 und pYES2.1CyP450_3
- Abbildung 4.27: DNA-Konstrukt pYES2.1CPR_1
- Abbildung 4.28: Linearisierung der Expressionsvektoren
- Abbildung 4.29: DNA-Konstrukte zur funktionellen Coexpression
- Abbildung 4.30: Nachweis der Klonierung der CPR_1 in den Vektor pCR2.1CyP_1 und pCR2.1CyP_3
- Abbildung 4.31: SDS-PAGE aktiver GFC-Fraktionen
- Abbildung 4.32: Biotransformation von Xanthophyllestern aus Paprikaoleoresin durch die Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.33: Sequenzalignment mit Lipase 2 aus *C. rugosa*
- Abbildung 4.34: Ausschnitt aus der Screening-PCR
- Abbildung 4.35: Gradient-PCR mit steigenden Annealingtemperaturen

- Abbildung 4.36: cDNA- und Aminosäuresequenz der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus* (Q5W281)
- Abbildung 4.37: Alignment der Xanthophyllesterasesequenz (Q5W281) mit der Lipase 2 aus *C. rugosa* (P32946)
- Abbildung 4.38: 3D-Modell der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.39: Ausschnitt des Alignments der Aminosäuresequenzen verschiedener Peroxidasen aus Basidiomyceten
- Abbildung 4.40: Koloniehybridisierung zur Isolierung der cDNA einer Peroxidase aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.41: DNA- und Aminosäuresequenz der Peroxidase aus *P. sapidus* (Q4QZ27)
- Abbildung 4.42: Aminosäuresequenz-Alignments der polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii* VPL1 (Q9UR19), VPL2 (O94753) und *P. sapidus* (Q4QZ27)
- Abbildung 4.43: Phylogramm verschiedener Peroxidasen aus Basidiomyceten
- Abbildung 4.44: 3D-Modelle der polyvalenten Peroxidasen aus *P. sapidus* und *P. eryngii*
- Abbildung 4.45: ESI-MS/MS-Spektren
- Abbildung 4.46: Aminosäuresequenz-Alignment von Laccasen aus *P. sapidus* (Pslac: AJ786026), *P. ostreatus* (Popoxa3: Q96TR4), *P. sajor caju* (Pslac3: Q7Z8S4) und von *Agaricus bisporus* (Ablcc2: Q12542)
- Abbildung 4.47: Reamplifikation zur Isolierung eines DNA-Fragments der Laccase 2 aus *P. sapidus*
- Abbildung 4.48: Amplifikation der Gesamtsequenz der Laccase 2 aus *P. sapidus* (AJ973225)
- Abbildung 4.49: cDNA- und Aminosäuresequenz der Laccase 2 aus *P. sapidus* (Q4VY49)
- Abbildung 4.50: Aminosäuresequenz-Alignment der Laccasen 1 und 2 (Q6A1A1 und Q4VY49)
- Abbildung 4.51: 3D-Modell der Laccase 2 aus *P. sapidus* (Q4VY49)
- Abbildung 4.52: 3D-Modell der Laccase 1 aus *P. sapidus* (Q6A1A1)
- Abbildung 5.1: 148 Cytochrom P450 Monooxygenasen aus 78 Familien aus Pilzen

- Abbildung 5.2: Zweikomponenten-System (Typ I) der CyP450 Monooxygenasen bei Eukaryoten
- Abbildung 5.3: Zielprodukte der Biotransformation
- Abbildung 5.4: Sequenzabschnitte der variablen Domänen V4, V6 und V9 aus der mitochondrialen SSU rRNA Gensequenz von *Agrocybe aegerita*
- Abbildung 5.5: Subtraktive Hybridisierung
- Abbildung 5.6: Zyklisch dargestellter Reaktionsmechanismus des Cytochrom P450 Monooxygenasesystems
- Abbildung 5.7: Xanthophyllesterhydrolyse mit isolierter Caboxylesterase aus *P. sapidus*
- Abbildung 5.8: Katalytische Zyklen verschiedener Peroxidasetypen

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Verwendete Mikroorganismen
Tabelle 3.2:	Verwendete Kits
Tabelle 3.3:	Verwendete Oligonukleotide
Tabelle 3.4:	Verwendete Vektoren zur Klonierung und Expression
Tabelle 3.5:	Verwendete Enzyme
Tabelle 3.6:	Verwendete Geräte
Tabelle 3.7:	Verwendete Chemikalien
Tabelle 3.8:	Verwendete Gase
Tabelle 3.9:	Verwendete Lösungsmittel
Tabelle 3.10:	Verwendete Bioinformatikprogramme und Datenbanken
Tabelle 3.11:	<i>Codon usage</i> von <i>P. sapidus</i>
Tabelle 3.12 :	Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit HotStarTaq-Polymerase (Qiagen)
Tabelle 3.13:	Programmierung der PCR-Reaktion mit HotStarTaq-Polymerase
Tabelle 3.14:	Zusammensetzung einer Realtime-PCR-Reaktion mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)
Tabelle 3.15:	HPLC-Anlage und Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität der Xanthophyllesterase aus <i>P. sapidus</i>
Tabelle 3.16:	GC-FID
Tabelle 3.17:	GC-MS
Tabelle 4.1:	Spezifische <i>Primer</i> zur Amplifikation der V6-Domäne
Tabelle 4.2:	Ergebnis der Datenbankrecherche (FASTA-Algorithmus) der V6-Sequenz aus <i>P. sapidus</i> (Pearson, 1990)
Tabelle 4.3:	<i>Primer</i> zur Amplifikation CyP450-spezifischer Fragmente
Tabelle 4.4:	Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der Monooxygenase CyP450_1
Tabelle 4.5:	Ergebnis der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der CyP450_3 Monooxygenase
Tabelle 4.6:	Vergleich der Monooxygenasen CyP450_1 und CyP450_3
Tabelle 4.7:	C _t -Werte der Amplifikationen CyP450_1, CyP450_3 und V6, ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ und Ratio
Tabelle 4.8:	Im CyP450-Aktivitätsassay verwendete Substrate

- Tabelle 4.9: Verwendete *Primer* zur Isolierung der cDNA einer P450 Reduktase
- Tabelle 4.10: Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der CPR_1 aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.11: C_t-Werte, ΔC_t und $\Delta\Delta C$ der Amplifikationen CPR_1 und V6
- Tabelle 4.12: Aminosäuresequenzen (Einbuchstabencode) tryptischer Peptide der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*, Edman-Sequenz
- Tabelle 4.13: Primerkonstruktionen für die Isolierung der cDNA der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.14: Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der Xanthophyllesterase
- Tabelle 4.15: Charakterisierung der Xanthophyllesterase aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.16: DNA-Sonde und *Primer* zur Isolierung der cDNA-Sequenz der Peroxidase aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.17: Resultat der FASTA-Datenbankrecherche der cDNA-Sequenz der Peroxidase aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.18: Molekülonen und Aminosäuresequenzen tryptischer Peptide der Laccase 2 aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.19: *Primer* zur Isolierung der cDNA-Sequenz der Laccase 2 aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.20: Ergebnis des FASTA-Datenbankvergleichs der Laccase 2 aus *P. sapidus*
- Tabelle 4.21: Vergleich der Laccasen 1 und 2 aus *P. sapidus*
- Tabelle 5.1: Cytochrom P450 Monooxygenasen aus Basidiomyceten
- Tabelle 5.2: Heterologe Produktion rekombinanter Proteine mit *P. pastoris*

9. Abkürzungsverzeichnis

AA/Bis	40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 :1)
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AOX	Alkoholoxidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin-Salz
bidest.	bidestilliert
Bis	N,N-Methylen-bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
CPR	P450 Reduktase
C _t -Wert	threshold cycle, Schwellenwertzyklus
CyP450	Cytochrom P450 Monooxygenase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
3D	dreidimensional
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI	Elektrospray Ionisation
E-Wert	Expectation-Wert, Erwartungswert
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<i>for</i>	<i>Forward</i>
FMN	Flavinmononukleotid

FU	Fluoreszenzeinheiten
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
His	Histidin
i	induziert
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
konz.	konzentriert
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LiP	Lignin-Peroxidase
M	Molarität
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
min	Minuten
μ	mikro
μL	Mikroliter
mL	Milliliter
MnP	Mangan-Peroxidase
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
NBT	4-Nitroblautetrazolinumchlorid
NECD	9-(Z)-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase
ni	nicht induziert
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
ori	Replikationsursprung

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>rev</i>	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute, „rotations per minute“
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSU	Small Subunit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TritonX-100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl)-phenyldecaethylenglykolester
tRNA	transfer-RNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichtes
VP	polyvalente Peroxidase
v/w	Volumen/Masse
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galaktosid
YNB	Yeast Nitrogen Base

LEBENS LAUF

Henning Bouws

Persönliche Angaben:

Geburtsdatum: 17. Juni 1974

Geburtsort: Neuenhaus

Schulbildung:

1987-1994

Gymnasium Nordhorn, Niedersachsen

Abitur

Zivildienst:

1994-1995

Paritätischer Wohlfahrtsverband, Nordhorn

Studium:

1995-1998

Grundstudium Biologie an der Universität Bielefeld

06/1998

Vordiplom

1998-2002

Hauptstudium Biologie

2001-2002

Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik

Technische Fakultät, Abteilung Biotechnologie

„Versuch der Produktion eines wirtstoxischen Proteins in *E. coli*“

08/2002

Diplom

Beruflicher Werdegang:

1997-2002

Gesellschaft für Sozialarbeit, Bielefeld

01/2000-03/2000

Bayer CropScience AG, F&E Insektizide

„Klonierung von neuen Genen aus cDNA-Bibliotheken“

04/2003-07/2003

Bioreact GmbH, Fermentation Systems & Bioreactors

„Biokonversion nachwachsender Rohstoffe“

10/2003-03/2004

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie
der Leibniz Universität Hannover

04/2004-06/2007

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelchemie
der Leibniz Universität Hannover

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation „ Molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Enzyme aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*“ selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

.....

Henning Bouws

